
Aus der Anatomischen Anstalt,
Lehrstuhl Anatomie I – Vegetative Anatomie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Jens Waschke

UNTERSUCHUNG DES CHONDROGENEN
DIFFERENZIERUNGSPOTENZIALS VON KANINEN
MESENCHYMALEN STAMMZELLEN (kMSZ) DURCH
KO-KULTUR MIT KANINEN PRIMÄREN CHONDROZYTEN
(kPCH) IN EINEM 3D-MASSENKULTURMODELL

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ye Han

aus Schanghai

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. Reinhard Putz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Matthias Schieker
Prof. Dr. Volkmar Jansson

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. vet. Constanze Buhrmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2015

***Meiner Familie und meinen
Freunden gewidmet***

Eine Reise, tausend Meilen lang,
mit einem ersten Schritt fing sie an !

Laozi

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG	1
1.1. KNORPELDEFEKTE UND KNORPELREKONSTRUKTION.....	1
1.2. ADULTE MESENCHYMALE STAMMZELLEN UND IHRE ANWENDUNG IN DER REGENERATIVEN MEDIZIN	3
2. FRAGESTELLUNG.....	5
3. MATERIAL UND METHODEN	7
3.1. MATERIALIEN.....	7
3.1.1. Spender.....	7
3.1.2. Antikörper	7
3.1.2.1. Primär-Antikörper	7
3.1.2.2. Sekundär- Antikörper	7
3.1.3. Wachstumsfaktoren	8
3.2. METHODEN	8
3.2.1. Isolierung der kaninen primären Chondrozyten (kPCh).....	8
3.2.2. Kultivierung der isolierten kaninen primären Chondrozyten (kPCh) in Monolayer-Kultur	8
3.2.3. Isolierung der kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) aus dem Knochenmark	10
3.2.4. Kultivierung der isolierten kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) aus dem Knochenmark in Monolayer-Kultur	10
3.2.5. 3D-High-Density Massenkultur (3D-HD-MK)	11
3.2.6. Western Blot Analyse	12
3.2.7. Densitometrie	13
3.2.8. Transmissionselektronenmikroskopie	13
3.2.9. Immunelektronenmikroskopie (IEM)	14
3.2.10. Immunfluoreszenz (IF)	15
3.2.11. Von Kossa Färbung	15
3.2.12. Oil-Red-O Färbung	16
3.2.13. Alcian-Blau Färbung	16

3.2.14. PKH- Membranfärbung	16
3.2.14.1. In Monolayer-Kultur	16
3.2.14.2. In 3D-High-Density Massenkultur	17
3.2.15. Charakterisierung der isolierten kaninen primären Chondrozyten (kPCh) ..	17
3.2.16. Charakterisierung der isolierten kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) aus dem Knochenmark	18
3.2.16.1. Nachweis Stammzell-spezifischer Zelloberflächenmarker mittels Immunfluoreszenz (IF)	19
3.2.16.2. Differenzierung der isolierten kMSZ zu Osteoblasten	20
3.2.16.3. Differenzierung der isolierten kMSZ zu Adipozyten	23
3.2.16.4. Differenzierung der isolierten kMSZ zu Chondroblasten	27
3.2.17. Ko-Kultur aus kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) und primären Chondrozyten (kPCh)	31
3.2.17.1. In 3D- High-Density-Massenkultur mit verschiedenen Mischungsverhältnissen	31
3.2.17.2. In Monolayer-Kultur mit PKH-Membranfärbung	33
3.2.18. Endozytose-Exozytose-Assay	33
4. ERGEBNISSE	34
4.1. EINFLUSS DER KO-KULTUR AUS MSZ UND PCH IN VERSCHIEDENEN MISCHUNGSVERHÄLTNISSEN IN 3D-HD-MASSENKULTUR AUF DIE CHONDROGENE DIFFERENZIERUNG VON MSZ	34
4.1.1. Untersuchung der Morphologie der 3D-HD-Massenkulturen mittels Transmissionselektronenmikroskopie	34
4.1.2. Untersuchung der extrazellulären Matrix der MSZ/PCh-Ko-Kulturen auf knorpelspezifische Proteine mittels Immunelektronenmikroskopie	37
4.1.3. Untersuchung der Proteinexpression der MSZ/PCh-Ko-Kulturen	40
4.2. ZELL-ZELL-INTERAKTION ZWISCHEN MSZ UND PCH IN MONOLAYER-KULTUR	50
4.2.1. Untersuchung der MSZ/PCh-Ko-Kulturen in PKH-Monolayer-Kultur	51
4.2.2. Endozytose-Exozytose-Assay	55
5. DISKUSSION	59
5.1. AUSWAHL DES ZELLMATERIALS	59
5.1.1. Kultivierung und Charakterisierung der isolierten kaninen primären Chondrozyten (kPCh) aus dem Knochenmark	60

5.1.2. Kultivierung, Charakterisierung und Differenzierung der isolierten kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) aus dem Knochenmark	61
5.2. AUSWAHL DER METHODEN	64
5.2.1. 3D-High-Density-Massenkultur und Chondrogenese	64
5.2.2. MSZ/PCh- Ko-Kultur und Chondrogenese	66
5.2.3. PKH-Fluoreszenz- Membranfärbung	68
5.2.4. Endozytose-Exozytose-Assay	71
5.3. AUSWIRKUNG DER KO-KULTUR AUS MSZ UND PCh IN 3D-HD-MASSENKULTUR AUF DIE CHONDROGENE DIFFERENZIERUNG VON MSZ	71
5.4. WECHSELWIRKUNGEN DER KO-KULTUR AUS MSZ UND PCh UND TGF- β_1 AUF DIE CHONDROGENESE VON MSZ IN 3D-HD-MASSENKULTUR.....	81
5.5. HYPERTROPHIE UND TERMINALE DIFFERENZIERUNG IN DER CHONDROGENESE VON MSZ UND MSZ/PCh-KO-KULTUREN IN 3D-HD-MASSENKULTUR	84
5.6. EINFLUSS DER ZELL-ZELL-INTERAKTION ZWISCHEN MSZ UND PCh AUF DIE CHONDROGENE DIFFERENZIERUNG VON MSZ IN 3D-HD-MASSENKULTUR	88
5.7. SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	90
6. ZUSAMMENFASSUNG	93
7. LITERATURVERZEICHNIS	96
8. DANKSAGUNG	116
9. ANHANG	118
9.1. VERÖFFENTLICHUNGEN UND VORTRÄGE	118
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	119

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN HUMANER AUS ALGINAT EMIGRIERTER CHONDROZYTEN IN MONOLAYER-KULTUR	9
ABBILDUNG 2 PHASENKONTRASTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME KANINER MESENCHYMALER STAMMZELLEN (kMSZ) IN MONOLAYER-KULTUR	11
ABBILDUNG 3 GRAFISCHE DARSTELLUNG DES 3D-HD-MASSENKULTURMODELLS UND PHOTOGRAPHISCHE AUFNAHME VON 3D-HD-MASSENKULTUREN IN PETRI-SCHALE	12
ABBILDUNG 4 IMMUNFLUORESZENZMIKROSKOPISCHE ANALYSE DER ISOLIERTEN KANINEN PRIMÄREN CHONDROZYTEN (kPCH)	18
ABBILDUNG 5 IMMUNFLUORESZENZMIKROSKOPISCHE ANALYSE DER ISOLIERTEN KANINEN MESENCHYMALEN STAMMZELLEN (kMSZ) AUS DEM KNOCHENMARK	19
ABBILDUNG 6 PHASENKONTRASTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN OSTEOGEN INDUZIERTER KANINER MSZ UND UNBEHANDELTEN MSZ NACH 21 TAGEN IN MONOLAYER- KULTUR MIT VON KOSSA FÄRBUNG	21
ABBILDUNG 7 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN OSTEOGEN INDUZIERTER KANINER MSZ UND UNBEHANDELTEN MSZ NACH 21 TAGEN IN MONOLAYER-KULTUR	22
ABBILDUNG 8 WESTERNBLOT-ANALYSE KANINER MSZ MIT/OHNE OSTEOGENE/R INDUKTION UND PRIMÄRE OSTEOZYTEN NACH 21 TAGEN IN MONOLAYER-KULTUR	23
ABBILDUNG 9 PHASENKONTRASTMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG ADIPOGEN INDUZIERTER KANINER MSZ UND UNBEHANDELTEN KONTROLL-MSZ NACH 23 TAGEN IN MONOLAYER-KULTUR MIT OIL-RED-O FÄRBUNG	24
ABBILDUNG 10 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN ADIPOGEN INDUZIERTER KANINER MSZ UND UNBEHANDELTEN KONTROLL-MSZ NACH 23 TAGEN IN MONOLAYER-KULTUR	25

ABBILDUNG 11 WESTERNBLOT-ANALYSE VON <i>KOLLAGEN TYP I</i> UND <i>ADIPONEKTIN</i> IN KANINEN MSZ MIT ODER OHNE ADIPOGENE/R INDUKTION UND PRIMÄREN ADIPOZYTEN NACH 23 TAGEN IN MONOLAYER-KULTUR	26
ABBILDUNG 12 WESTERNBLOT-ANALYSE VON <i>B₁-INTEGRIN</i> UND <i>PPAR-γ</i> IN KANINEN MSZ MIT ODER OHNE ADIPOGENE/R INDUKTION UND PRIMÄREN ADIPOZYTEN NACH 23 TAGEN IN MONOLAYER-KULTUR	26
ABBILDUNG 13 LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN CHONDROGEN INDUZIERTER KANINER MSZ UND UNBEHANDELTEN MSZ NACH 14 TAGEN IN 3D-HD-MASSKULTUR SOWIE NATIVEN KNORPELS MIT ALCIAN-BLAU FÄRBUNG	28
ABBILDUNG 14 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN CHONDROGEN INDUZIERTER KANINER MSZ UND UNBEHANDELTEN KONTROLL-MSZ NACH 14 TAGEN IN 3D-HD-MASSKULTUR	29
ABBILDUNG 15 WESTERNBLOT-ANALYSE VON <i>KOLLAGEN TYP II</i> UND <i>CSPG</i> IN KANINEN MSZ MIT ODER OHNE CHONDROGENE/R INDUKTION UND PCH NACH 14 TAGEN IN 3D-HD-MASSKULTUR	30
ABBILDUNG 16 WESTERNBLOT-ANALYSE VON <i>B₁-INTEGRIN</i> , <i>SHC</i> UND <i>SOX-9</i> IN KANINEN MSZ MIT ODER OHNE CHONDROGENE/R INDUKTION UND PCH NACH 14 TAGEN IN 3D-HD-MASSKULTUR	31
ABBILDUNG 17 50/50 MSZ/PCH-KO-KULTUR MIT <i>PKH-MEMBRANFÄRBUNG</i> IN 3D-HD-MASSKULTUR	32
ABBILDUNG 18 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON KANINEN PCH, MSZ UND MSZ/PCH-KO-KULTUREN IN VERSCHIEDENEN MISCHUNGSVERHÄLTNISSSEN MIT ODER OHNE CHONDROGENE/R INDUKTION NACH 21 TAGEN IN 3D-HD-MASSKULTUR	36
ABBILDUNG 19 IMMUNELEKTRONENMIKROSKOPISCHE MARKIERUNG VON <i>KOLLAGEN TYP II</i> IN KANINEN MSZ/PCH KO-KULTUREN MIT VERSCHIEDENEN MISCHUNGSVERHÄLTNISSSEN UND 100% PCH MIT ODER OHNE CHONDROGENE/R INDUKTION NACH 21 TAGEN IN 3D-HD-MASSKULTUR	38

ABBILDUNG 20 IMMUNELEKTRONENMIKROSKOPISCHE MARKIERUNG VON <i>CSPG</i> IN KANINEN MSZ/PCH KO-KULTUREN MIT VERSCHIEDENEN MISCHUNGSVERHÄLTNISSSEN UND 100% PCH MIT ODER OHNE CHONDROGENE/R INDUKTION NACH 21 TAGEN IN 3D-HD-MASSENKULTUR	39
ABBILDUNG 21 WESTERNBLOT-ANALYSE VON <i>KOLLAGEN TYP II</i> IN KULTUREN AUS 100% MSZ UND 100% PCH SOWIE KO-KULTUREN IN VERSCHIEDENEN MISCHUNGSVERHÄLTNISSSEN NACH 21 TAGEN IN 3D-HD-MASSENKULTUR MIT ODER OHNE CHONDROGENE/R INDUKTION	41
ABBILDUNG 22 WESTERNBLOT-ANALYSE VON <i>CSPG</i> IN KULTUREN AUS 100% MSZ, 100% PCH UND KO-KULTUREN IN VERSCHIEDENEN MISCHUNGSVERHÄLTNISSSEN NACH 21 TAGEN IN 3D-HD-MASSENKULTUR MIT ODER OHNE CHONDROGENE/R INDUKTION	42
ABBILDUNG 23 WESTERNBLOT-ANALYSE VON <i>B₁-INTEGRIN</i> IN KULTUREN AUS 100% MSZ, 100%PCH UND KO-KULTUREN IN VERSCHIEDENEN MISCHUNGSVERHÄLTNISSSEN NACH 21 TAGEN IN 3D-HD-MASSENKULTUR MIT ODER OHNE CHONDROGENE/R INDUKTION	44
ABBILDUNG 24 WESTERNBLOT-ANALYSE VON <i>SHC</i> IN KULTUREN AUS 100% MSZ, 100%PCH UND KO-KULTUREN IN VERSCHIEDENEN MISCHUNGSVERHÄLTNISSSEN NACH 21 TAGEN IN 3D-HD-MASSENKULTUR MIT ODER OHNE CHONDROGENE/R INDUKTION	45
ABBILDUNG 25 WESTERNBLOT-ANALYSE VON <i>ERK</i> IN KULTUREN AUS 100% MSZ, 100%PCH UND KO-KULTUREN IN VERSCHIEDENEN MISCHUNGSVERHÄLTNISSSEN NACH 21 TAGEN IN 3D-HD-MASSENKULTUR MIT ODER OHNE CHONDROGENE/R INDUKTION	47
ABBILDUNG 26 WESTERNBLOT-ANALYSE VON <i>SOX-9</i> IN KULTUREN AUS 100% MSZ, 100%PCH UND KO-KULTUREN IN VERSCHIEDENEN MISCHUNGSVERHÄLTNISSSEN NACH 21 TAGEN IN 3D-HD-MASSENKULTUR MIT ODER OHNE CHONDROGENE/R INDUKTION	48
ABBILDUNG 27 WESTERNBLOT-ANALYSE VON <i>KOLLAGEN TYP X</i> IN KULTUREN AUS 100% MSZ, 100%PCH UND KO-KULTUREN IN VERSCHIEDENEN MISCHUNGSVERHÄLTNISSSEN NACH 21 TAGEN IN 3D-HD-MASSENKULTUR MIT ODER OHNE CHONDROGENE/R INDUKTION	50
ABBILDUNG 28 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE ÜBERSICHTSAUFNAHMEN VON KO-KULTUR AUS MSZ UND PCH MIT PKH-MEMBRANFÄRBUNG NACH EINTÄGIGER INKUBATION IN MONOLAYER-KULTUR MIT NORMALEM MEDIUM	51

ABBILDUNG 29 LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON KO-KULTUR AUS MSZ UND PCH MIT PKH-FÄRBUNG NACH EINTÄGIGER INKUBATION IN MONOLAYER-KULTUR MIT NORMALEM MEDIUM	52
ABBILDUNG 30 LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON KO-KULTUR AUS MSZ UND PCH MIT PKH-FÄRBUNG NACH ZWEITÄGIGER INKUBATION IN MONOLAYER-KULTUR MIT NORMALEM MEDIUM	53
ABBILDUNG 31 LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON KO-KULTUR AUS MSZ UND PCH MIT PKH-FÄRBUNG NACH DREITÄGIGER INKUBATION IN MONOLAYER-KULTUR MIT NORMALEM MEDIUM	54
ABBILDUNG 32 LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON KO-KULTUR AUS MSZ UND PCH MIT PKH-FÄRBUNG NACH VIERTÄGIGER INKUBATION IN MONOLAYER-KULTUR MIT NORMALEM MEDIUM	55
ABBILDUNG 33 TEM-AUFNAHMEN VON MSZ PRÄ-INKUBIERT MIT AN GOLDPARTIKEL (10NM) GEKOPPELTEN SEKUNDÄRANTIKÖRPERN NACH 24H IN SUSPENSION MIT NORMALEM MEDIUM	56
ABBILDUNG 34 TEM-AUFNAHMEN VON PCH PRÄ-INKUBIERT MIT AN GOLDPARTIKEL (5NM) GEKOPPELTEN SEKUNDÄRANTIKÖRPERN NACH 24H IN SUSPENSION MIT NORMALEM MEDIUM	57
ABBILDUNG 35 TEM-AUFNAHMEN VON 50/50 MSZ/PCH-KO-KULTUR PRÄ-INKUBIERT MIT AN GOLDPARTIKEL (MSZ 10NM, PCH 5NM) GEKOPPELTEN SEKUNDÄRANTIKÖRPERN NACH 48H IN SUSPENSION MIT NORMALEM MEDIUM	58

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
AD-MSCs	mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe
AFAP	Actin filament-associated protein
Agc	Aggrekan
ALP	alkalische Phosphatase
Ampho B	Amphotericin B
AP-1	Activator protein 1
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATF	Activating transcription factor
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat/Nitro-Blue-Tetrazolium
BMSCs	Knochenmarksstromazellen
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovines Serum-Albumin
bspw	beispielsweise
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca	circa
Cbfa	C-module-binding factor A
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein
cm	Centimeter
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSPG	Chondroitin-sulfatierte Proteoglykane/Cartilage specific proteoglycans
d	Tag(e)
Da	Dalton
DEC	Diethylcarbamazin

DKK3	Dickkopf-related protein 3
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles`-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
Erk	Extracellular-signal regulated kinase
ESCs	Embryonale Stammzellen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAK	Fokaladhäsionskinase
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FZD7	Frizzled-7
g	Gramm
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
h	Stunden
HAC	humane artikuläre Chondrozyten
HAM's	R.G. Ham's Medium
HD	High-Density
HMECs	humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HMG-box	High Mobility Group box
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IEM	Immunelektronenmikroskopie
IF	Immunfluoreszenz
IGF	Insulin-like growth factor
ISCT	International Society for Cellular Therapy
IU	International Units
JNK	c-Jun N-terminal kinase
l	Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

μM	Mikromol
M	Mol
MACT	Matrix-assoziierte autologe Chondrozytentransplantation
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MEV	Markraum eröffnende Verfahren
min	Minuten
mg	Milligramm
MK	Massenkultur
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
NBT	Nitrotetrazoliumblauchlorid
N-CAM	Neural cell adhesion molecule
NFκB	Nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP	Nucleus pulposus
OCT	Osteochondrale Transplantation
OECs	olfaktoriellen Schwannzellen
OsO ₄	Osmiumtetroxid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCh	Primäre Chondrozyten
PDGF	Platelett derived growth factor
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
PKH	Paul Karl Horan
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon-related Protein

PTPRF	Protein tyrosine phosphatase receptor F
RAB3B	Ras-related protein Rab-3B
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
Rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SBE	Smad binding elements
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt
sek	Sekunden
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Shc	Src homology and collagen
Smad	Small body size mothers against decapentaplegic
Sos	Son of Sevenless
Sox	SRY (sex determining region Y)-box
Strep	Streptomycin
Tab	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEP	Totalendoprothese
TGF	Transforming Growth Factor

1. EINLEITUNG

Chondrale oder osteochondrale Läsionen werden bei mehr als 60% der Patienten gefunden, die sich einer Arthroskopie unterziehen und stellen somit eine häufige klinische Diagnose dar (Hjelle et al., 2002; Widuchowski et al., 2007). Aufgrund der grundsätzlich begrenzten Regenerationsfähigkeit des Knorpels stellt die Behandlung desselben die Medizin bis heute vor große Herausforderungen (Chiang et al., 2009; Hunter, 1995). Die gegenwärtig modernen klinischen Verfahren wie die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) weisen jedoch noch wichtige therapeutische Einschränkungen und Komplikationen im Langzeitverlauf auf, wie z.B. die Spendermorbidity, die Dedifferenzierung der Chondrozyten mit Verlust der chondrogenen Eigenschaften *in vitro* sowie die Hypertrophie und Delamination des Transplantats *in vivo* (Madry et al., 2011). Vor diesem Hintergrund verspricht die Transplantation von mesenchymalen Stammzellen (MSZ) in Defektareale dank deren multipotenten Differenzierungspotenzials einen innovativen Alternativansatz dar, um Knorpeldefekte in Zukunft adäquat zu versorgen (Filardo et al., 2013b; Madry et al., 2011). Die unterschiedlichen Ergebnisse der klinischen Applikation von mesenchymalen Stammzellen indes zeigen den enormen Bedarf an weiteren Untersuchungen, um die komplexen und multifaktoriellen Prozesse der Differenzierung von MSZ zu funktionellen Gewebszellen weiter zu beleuchten (Centeno et al., 2008; Davatchi et al., 2011; Emadedin et al., 2012; Haleem et al., 2010; Kasemkijwattana et al., 2011; Nejadnik et al., 2010; Wakitani, S. et al., 2002). Diese Arbeit soll daher einen Beitrag leisten, durch Ko-Kultur von mesenchymalen Stammzellen (MSZ) und primären Chondrozyten (PCh) sowohl in einem 3D-Massenkulturmodell als auch in Monolayer-Kultur die Chondrogenese von MSZ eingehender zu analysieren, um so neue Einblicke in den Differenzierungsprozess von Stammzellen und daraus ableitend bessere Erkenntnisse für die klinische Anwendung von MSZ zu Knorpelrekonstruktion und -ersatz zu gewinnen.

1.1. Knorpeldefekte und Knorpelrekonstruktion

Knorpelschäden haben im natürlichen Verlauf eine schlechte Heilungsprognose (Madry et al., 2011). Die fehlende Zellinfiltration nach Verletzung aufgrund der Avaskularität und die Abschirmung der Chondrozyten von immunologischen Reaktionen durch die

extrazelluläre Matrix werden als Ursachen der intrinsisch begrenzten Regenerationsfähigkeit angesehen (Chiang et al., 2009). Unbehandelt führen Knorpeldefekte oft zur vorzeitigen sekundären Arthrose, die im klinischen Endstadium nur durch endoprothetischen Gelenkersatz mit all seinen Risiken und Langzeitfolgen sinnvoll therapiert werden kann (Madry et al., 2011; Umlauf et al., 2010).

Verschiedene Konzepte zur Behandlung von osteochondralen Defekten wurden bisher entwickelt. Während konservative Behandlungsstrategien mithilfe antiinflammatorischer Pharmazeutika und intraartikulärer Injektion von Steroiden und Hyaluronsäure im Wesentlichen auf die Symptomkontrolle zielen und bestenfalls nur den Krankheitsprogress verlangsamen können, versuchen chirurgische Verfahren sowohl die Gelenkfunktion zu erhalten und zu verbessern als auch das Übergreifen osteoarthrotischer Schädigungen auf gesunde Areale des Gelenks zu verhindern (Madry et al., 2011). Ältere chirurgische Konzepte zur Knorpelrekonstruktion wie Débridement und Abrasionsarthroplastik sowie den Markraum eröffnende Verfahren (MEV) zur Rekrutierung mesenchymaler Progenitorzellen führten jedoch nicht selten zur Bildung eines biomechanisch und strukturell minderwertigen Reparaturgewebes aus Faserknorpel (Chiang et al., 2009; Madry et al., 2011). Darüber hinaus kommen sie nur bestimmten Patienten mit spezieller Indikation zugute, so dass ihre Anwendungsmöglichkeiten deutlich eingeschränkt sind (Mithoefer et al., 2009). Neuere chirurgische Strategien konzentrieren sich deshalb auf den Einsatz von Autografts, wie z.B. die autologe osteochondrale Transplantation (OCT) mittels Mosaikplastik und die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) (Harris et al., 2011; Madry et al., 2008; Vavken et al., 2010). Gegenwärtig bildet insbesondere die Weiterentwicklung der klassischen ACT zur matrix-assoziierten ACT (MACT) aufgrund des nachweisbaren klinischen Nutzens die Hauptstütze zur Behandlung großer fokaler Knorpeldefekte (Chiang et al., 2009; Madry et al., 2011).

Dennoch birgt die ACT noch gravierende Nachteile und Risiken in sich, wie z. B. die entnahmebedingte Verletzung gesunden Knorpels am Spender (Spendermorbidity), die geringe Ausbeute vitaler Chondrozyten im arthrotischen Gelenk und somit die Notwendigkeit zur *in vitro* Expansion derselben mit möglicher Dedifferenzierung der Chondrozyten und Hypertrophie der reimplantierten Knorpelkonstrukturen *in vivo* mit anschließender Ossifikation und Transplantat-Delamination mit

Re-Operationspflichtigkeit (Breinan et al., 2001; Nehrer et al., 2009). Aus diesen Gründen ist die Suche nach alternativen Verfahren und innovativen Therapieansätzen wie das Tissue Engineering und die Transplantation von adulten mesenchymalen Stammzellen dringend notwendig.

1.2. Adulte mesenchymale Stammzellen (MSZ) und ihre Anwendung in der regenerativen Medizin

Mesenchymale Stammzellen (MSZ) sind adulte unspezialisierte Vorläuferzellen in verschiedenen Geweben wie z.B. Knochenmark, Fettgewebe, Synovialmembran, Periosteum, Muskel und Nabelschnurblut, die physiologisch als Zellreservoir für die Erneuerung und Homöostase von Gewebszellen mesodermalen Ursprungs wie z.B. Knochen, Knorpel, Muskel, Fett und Sehnen verantwortlich sind (Spencer et al., 2011). Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Aufrechterhaltung der phänotypischen Stabilität, ihres multipotenten Differenzierungspotenzials (Plastizität), ihrer einfachen Isolierung aus den oben genannten Geweben und ihrer relativ unkomplizierten und sicheren Handhabung *in vitro* (Praktikabilität) gelten MSZ deshalb als idealer Kandidat in der regenerativen Medizin und im Tissue-Engineering von Knochen- und Knorpel-Neokonstrukten (Filardo et al., 2013b; Lee, E. H. et al., 2006; Spencer et al., 2011). Zudem bringen sie mit ihrem ausgeprägten Migrationsverhalten (Homing/Trafficking) zu verletzten Geweben, ihren trophischen Effekten wie die Synthese proangiogener und regenerativer Moleküle und ihren immunmodulatorischen Fähigkeiten vielversprechende Voraussetzungen für die klinische Anwendung mit (Filardo et al., 2013b).

In der Therapie von osteochondralen Defekten wurde in letzter Zeit vielfach versucht mittels verschiedener Applikationstechniken (Davatchi et al., 2011; Giannini et al., 2010) und Trägermaterialien (Kollagen-Gel, Scaffold und Keramik) (Chen, W. C. et al., 2011; Hofmann et al., 2006; Lee, J. W. et al., 2004) sowie mithilfe bestimmter Wachstumsfaktoren (TGF- β , BMP-2, BMP-4 und PDGF) (Kim, H. J. et al., 2009; McCarty et al., 2009; Mimura et al., 2011; Re'em et al., 2012) oder gar via Transfer von Genvektoren (TGF- β , SOX5, SOX6, SOX9 etc.) (Cao et al., 2011; Chen, W. C. et al., 2011; Grande et al., 2003) Therapiemöglichkeiten und -Grenzen für mesenchymale Stammzellen (MSZ) zu identifizieren. Die hohe Anzahl an präklinischen Studien und die durchwachsenen

klinischen Ergebnisse spiegeln jedoch das limitierte Wissen über und die fehlende Erfahrung mit diesen Zellen wider (Filardo et al., 2013b). Grundlegende Forschungsarbeiten und besser durchgeführte Studien sind daher noch notwendig, um die fundamentalen Mechanismen der MSZ-Differenzierung zu verstehen und die klinische Anwendbarkeit von MSZ weiter zu verbessern.

2. FRAGESTELLUNG

Tissue-Engineering als ein innovatives Forschungsgebiet mit wachsender Geschwindigkeit verspricht durch die Imitation von Schlüsselereignissen der Organogenese geeignete Konstrukte *in vitro* zu erzeugen, um anschließend durch Implantation in Defektareale Organ- und Gewebefunktionen *in vivo* zu verbessern, zu ersetzen oder zu regenerieren (Caplan et al., 1999; Langer, 2000; Solchaga et al., 2001). Durch neue und verbesserte Kenntnisse über die Embryonalentwicklung in letzter Zeit eröffnet Tissue Engineering heute innovative Therapiemöglichkeiten mit regenerativen Ansätzen für die Behandlung von Knochen- und Knorpeldefekten (Caplan, 2000). Eine Reihe von wegweisenden Arbeiten konnte bereits die therapeutische Potenz und die klinische Praktikabilität von MSZ sowohl im Tiermodell als auch in der Therapie von osteochondralen Läsionen verdeutlichen (Filardo et al., 2013a; Jung et al., 2009; Matsumoto et al., 2010; Nejadnik et al., 2010; Noth et al., 2008; Quarto et al., 2001; Wakitani, S. et al., 1994). Die bisherigen Ergebnisse sind ermutigend und konnten sowohl durch subjektive Kriterien wie Symptomlinderung bestätigt als auch anhand histologischer, arthroskopischer und bildgebender Verfahren objektiviert werden (Filardo et al., 2013b). Dennoch besteht noch eine Reihe von ungelösten Problemen wie bspw. die instabile chondrogene Differenzierung von MSZ *in vitro*, die Transdifferenzierung zu Faserknorpel und die Hypertrophieeigung von MSZ *in vivo* (Hunziker, E., 2002; Johnstone et al., 1999; Mueller et al., 2010; Punwar et al., 2011; Wakitani, Shigeyuki et al., 2004).

Der Knorpel entsteht durch die Kondensation von mesenchymalen Stammzellen zu dreidimensionalen Zellaggregaten, die im weiteren Verlauf unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und interzellulärer Kommunikation bestimmte „Differenzierungsgene“ in- oder aktivieren und so die Chondrogenese einleiten (Denker et al., 1999; Hall et al., 2000; Jones, D. L. et al., 2008; Kuhn et al., 2010; Song et al., 2006). Die Mehrzahl der Forschungsarbeiten konzentriert sich derzeit noch auf die chondrogene Induktion von MSZ mittels Wachstumsfaktoren und Genmanipulation (Cao et al., 2011; Cucchiaroni et al., 2011; Kim, H. J. et al., 2009; Puetzer et al., 2010). Wenige Versuche wurden jedoch bisher unternommen mesenchymale Stammzellen und primäre Chondrozyten (PCh) in Ko-Kultur zu untersuchen, um Effekte der Ko-Kultur

und Zell-Zell-Interaktion auf das chondrogene Differenzierungspotenzial von MSZ zu beleuchten.

Diese Arbeit setzt daher an den physiologischen Vorgängen an und versucht durch Ko-Kultur von mesenchymalen Stammzellen (MSZ) und primären Chondrozyten (PCh) in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit oder ohne Wachstumsfaktoren sowohl in 3D-High-Density Massenkultur als auch in Monolayer-Kultur folgende Fragen genauer zu beantworten.

- Sind primäre Chondrozyten (PCh) in der Lage in der 3D-High-Density Massenkultur Chondrogenese in den ko-kultivierten mesenchymalen Stammzellen (MSZ) zu induzieren und zu verstärken?
- Geschieht die chondrogene Induktion auch ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren?
- Lässt sich die chondrogene Induktion durch Zell-Zell-Interaktion in der Ko-Kultur erklären und welche fundamentalen interzellulären Prozesse sind daran im Detail beteiligt?
- Spielt das Mischungsverhältnis zwischen MSZ und PCh eine wesentliche Rolle für die Chondrogenese von MSZ in 3D-HD-Massenkultur?
- Können Wachstumsfaktoren im Zusammenspiel mit MSZ/PCh- Ko-Kultur die Chondrogenese von MSZ verstärken?
- Können 3D-HD-Massenkultur und MSZ/PCh-Ko-Kultur chondrogene Hypertrophie unterdrücken und so die Chondrogenese von MSZ *in vitro* stabilisieren?

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen zum besseren Verständnis für die chondrogene Differenzierung von MSZ beitragen und neue Möglichkeiten und Erkenntnisse für die klinische Applikation von MSZ und das Tissue-Engineering von Knorpelkonstrukten zur rekonstruktiven Therapie von osteochondralen Defekten eröffnen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Materialien

3.1.1. Spender

Das Knochenmark zur Isolation der kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) und das Knorpelgewebe zur Gewinnung der kaninen primären Chondrozyten (kPCh) stammen aus der Chirurgischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München von Hunden, die einer totalen endoprothetischen Hüftoperation (Quarto et al.) unterzogen wurden. Für die Ko-Kultur Experimente wurden jeweils Zellen aus demselben Tier verwendet.

3.1.2. Antikörper

3.1.2.1. Primär-Antikörper

Anti- Kollagen Typ I (PAB 749)	Chemicon Intl., Temecula, CA, USA
Anti- Kollagen Typ II (PAB 746)	Chemicon Intl., Temecula, CA, USA
Anti- Kollagen Typ X	Chemicon Intl., Temecula, CA, USA
Anti- β 1-Integrin (MAB 1965)	Transduction, Lexington, USA
Anti- Cartilage-specific proteoglycans (MAB2015)	Chemicon Intl., Temecula, CA, USA
Anti- Cbfa-1 (CBFA-11-A)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Anti- Osteocalcin (PAB1857)	Chemicon Intl., Temecula, CA, USA
Anti- β -Aktin (A4700)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Anti- Adiponectin (ACRP302-S)	Alpha Diagnostics Int Inc., SA, TX, USA
Anti- PPAR- γ (SP5301P)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Anti- ERK 1/2 (44-6806)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Anti- Shc (44- 830)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Anti- Sox-9 (AP06583PU-N)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Anti- CD105 (BM2221)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Anti- CD90 (BM2343)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Anti- CD45 (SM3025)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Anti- CD34 (SM1095)	Acris, Hiddenhausen, Germany

3.1.2.2. Sekundär- Antikörper

Sheep anti-rabbit (alk. Phosph.) IgG	Chemicon Intl., Temecula, CA, USA
Sheep anti-mouse (alk. Phosph.) IgG	Chemicon Intl., Temecula, CA, USA
Mouse anti-goat (alk. Phosph.) IgG	Dianova, Hamburg, Germany
Rabbit anti-goat (Rhodamin Red) IgG	Dianova, Hamburg, Germany
Rabbit anti-goat (FITC) IgG	Dianova, Hamburg, Germany

Immunogold GAM (Gold gekoppelt 5nm)

Amersham, Braunschweig, Germany

Immunogold GAR (Gold gekoppelt 10nm)

Amersham, Braunschweig, Germany

3.1.3. Wachstumsfaktoren

Transforming Growth Factor β 1 (hTGF- β 1)

Acris, Hiddenhausen, Germany

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung der kaninen primären Chondrozyten (kPCh)

Die verwendeten kaninen Chondrozyten stammen aus Knorpelgewebe des Femurkopfes, der im Rahmen einer Hüftgelenkersatzoperation (Quarto et al.) steril entnommen wurde. Nach der Entnahme wurde er im Transportmedium (Ham's-F12/DMEM) auf Eis transportiert. Im Zellkulturlabor folgten Spülgänge mit Spülmedium (Ham's-F12/Pen/Strep/Ampho B) und Hanks Salzlösung. Von gesunden Arealen des Femurkopfes wurden nach sorgfältiger Entfernung von Bindegewebe und Knochensplittern Knorpelscheibchen herunter geschnitten, in 3 - 5 mm große Stückchen zerkleinert und mehrmals gespült. Es folgte der enzymatische Abbau der Knorpelstückchen zunächst mittels Inkubation mit 1%iger Pronase für anderthalb bis zwei Stunden im Schüttelwasserbad bei 37°C. Nach erneutem Spülen wurde anschließend mit 0,2%iger Kollagenase für drei bis vier Stunden im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Die entstandene Suspension wurde zweimal durch einen Nylon-Polyamid Gazefilter PA 100/31 filtriert und anschließend bei 1000 – 1200 U/min für fünf Minuten im Rundröhrchen zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde nach weiterem mehrmaligem Spülen, anschließender Zentrifugierung und Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer in eine T75 Falcon Kulturflasche mit normalem Zellkulturmedium (Hams-F12/DMEM 1:1, 10% fetales Kälberserum (FCS), 1% Partricin-Lösung, 1% Penicillin/Streptomycin Lösung (10000IU/10000IU), 75µg/ml Ascorbinsäure, 1% essentielle Aminosäuren und 1% Glutamin) mit der Zelldichte von ca. 500.000/Flasche ausgesät und unter Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C) inkubiert.

3.2.2 Kultivierung der isolierten kaninen primären Chondrozyten (kPCh) in Monolayer-Kultur

Die In-vitro-Kultivierung von Chondrozyten in Monolayer-Kultur wird seit Jahrzehnten durchgeführt und hat sich als eine technisch einfache und ökonomische Methode

etabliert. Allerdings ändern primäre Chondrozyten in der Monolayer-Kultur zeitabhängig ihren Phänotyp und ihre Eigenschaften. Die frisch isolierten Chondrozyten zeigten eine oval bis rundliche, charakteristisch chondrale Morphologie (Abb. 1). Nach mehreren Stunden adhärten die Chondrozyten an der Oberfläche der Zellkulturflaschen und bildeten eine Monolayer-Kultur aus. Dabei flachten sie sich ab, streckten sich und bildeten zytoplasmatische Fortsätze aus, über die sie aktiv Kontakt zu anderen Chondrozyten in der Umgebung suchten. Die Zellmorphologie änderte sich von rundlich zu oval bis spindelförmig (Abb. 1). Nach 72-stündiger Proliferation in der Monolayer-Kultur zeigten die Chondrozyten eine fibroblastenähnliche spindelförmige Morphologie mit weit reichenden zytoplasmatischen Fortsätzen und erreichten eine 70% bis 80%ige Konfluenz (Abb. 1). Anschließend wurden die Chondrozyten durch Trypsin abgelöst und in neuen Passagen weiter vermehrt. Da es erfahrungsgemäß in der Monolayer-Kultur zu Dedifferenzierung der Chondrozyten und somit zum Verlust der knorpeltypischen Eigenschaften kommt (Shakibaei et al., 1995), wurden die Zellen spätestens nach der dritten Passage mit Gefriermedium für spätere Untersuchungen im Flüssigstickstofftank bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert oder direkt in Ko-Kulturversuche mit mesenchymalen Stammzellen überführt.

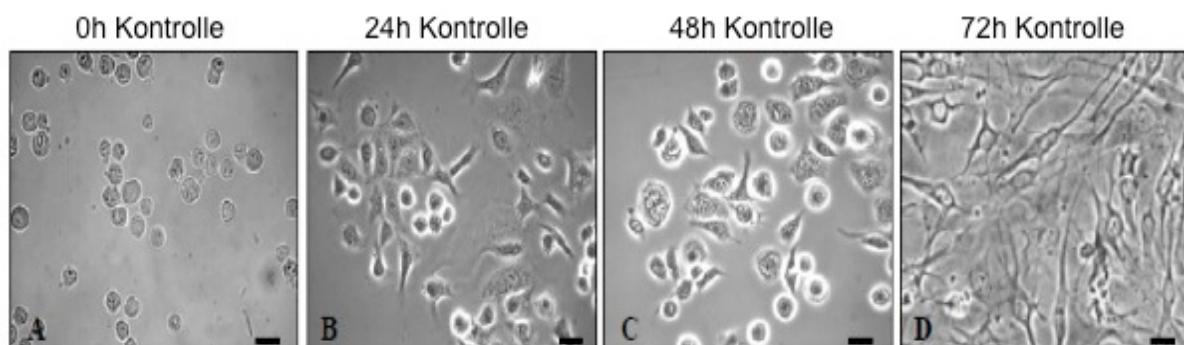


Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahmen humaner aus Alginat emigrierter Chondrozyten in Monolayer-Kultur nach 0h, 24h, 48h und 72h. A-D: 200x; Bars = 25μm ; Aus Seifarth, C. (Seifarth, 2009)

3.2.3 Isolierung der kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) aus dem Knochenmark

Das Knochenmark zur Isolierung der mesenchymalen Stammzellen wurde bei der oben erwähnten TEP-Operation durch Aspiration aus dem Femurhals des Hundes entnommen und in ein 50ml Falcon-Tube mit Transportmedium überführt (Ham's-F12/DMEM/3% Citrat). Nach Auffüllen und Homogenisieren mit Hanks Salzlösung im Zellkulturlabor wurde das Knochmarksgemisch über Ficoll tröpfchenweise in ein zweites Röhrchen pipettiert. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, dass sich beide Schichten nicht mischen. Nach 30-minütiger Zentrifugierung bei 20°C und 440G wurde der Überstand verworfen und die mittlere Schicht entnommen. Dann wurde sie mit Hanks Salzlösung resuspendiert, noch weitere dreimal gespült und für jeweils 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit normalem Zellkulturmedium wie oben beschrieben resuspendiert, in eine T75 Falcon Kulturflasche ausgesät und unter Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C) inkubiert. Nach 4 Tagen wurden die nicht adhärenierten Zellen mit Hanks Salzlösung gespült und verworfen und frisches Medium dazu gegeben. Nach einer Woche wurde die erste Passage durchgeführt, sobald sich 4 -5 Kolonien mit fibroblastenähnlichen Zellen gebildet hatten.

3.2.4 Kultivierung der isolierten kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) aus dem Knochenmark in Monolayer-Kultur

Bezüglich der Kultivierung von Stammzellen in Monolayer-Kultur wurde in vergangenen Jahren viel Erfahrung gesammelt; sie stellt derzeit eine Standardmethode dar. Die frisch isolierten mesenchymalen Stammzellen zeigten ein polymorphes Aussehen von spindelförmig und fibroblastenähnlich bis polygonal und sternförmig mit granulierten Nuklei und teils plumpen teils langen feinen Pseudopodien, über die sie aktiv zellulären Kontakt suchten (Abb. 2). Jeden dritten Tag erfolgte Mediumwechsel; die Zellen wurden nach Erreichen der 60-70%igen Konfluenz passagiert. Nach der dritten oder vierten Passage wurden die Zellen entweder wie oben beschrieben kryokonserviert oder direkt für Experimente verwendet.

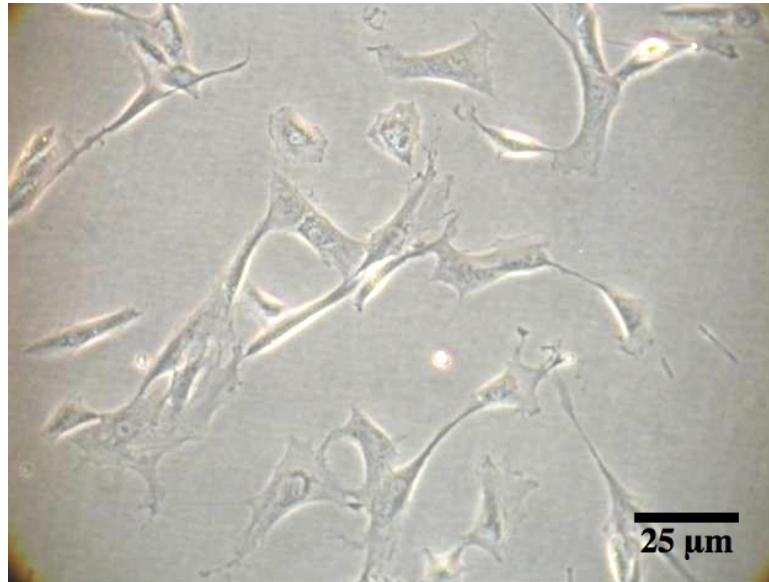


Abb. 2: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme kaniner mesenchymaler Stammzellen (kMSZ) in Monolayer-Kultur.

3.2.5 3D-High-Density Massenkultur (3D-HD-MK)

Für das 3D-HD-Massenkultur-Modell (Abb. 3) besteht in der Arbeitsgruppe langjährige Erfahrung (Shakibaei et al., 1993). Das 3D-HD-Massenkulturmodell begünstigt durch seine hohe Zelldichte intensive Zell-Zell-Interaktionen und bietet die Möglichkeit *in vivo* ähnliche organoide Strukturen herzustellen. Durch die Ernährung der Zellkulturen per Diffusion an der Medium-Zell-Grenze wird die *in vivo* Situation in Gelenken simuliert. Zur Durchführung der Versuche wurde in eine mit Medium gefüllte Petrischale eine sterile Stahlnetzbrücke platziert, worauf ein Filter aus Nitrozellulosepapier aufgelegt wurde. Anschließend wurde eine 7-8 μl Zellsuspension bestehend aus ca. 1 Mio. Zellen auf den Filter an der Luft-Medium-Grenze pipettiert und unter Standardbedingungen kultiviert. Pro Filter können 6 -8 Massenkulturen platziert werden. Die Zellen werden per Diffusion an der Medium-Filter Grenze mit Mediumbestandteilen versorgt. Nach ca. 24h kondensierten die Zellen zur 3D- High-Density-Massenkultur.

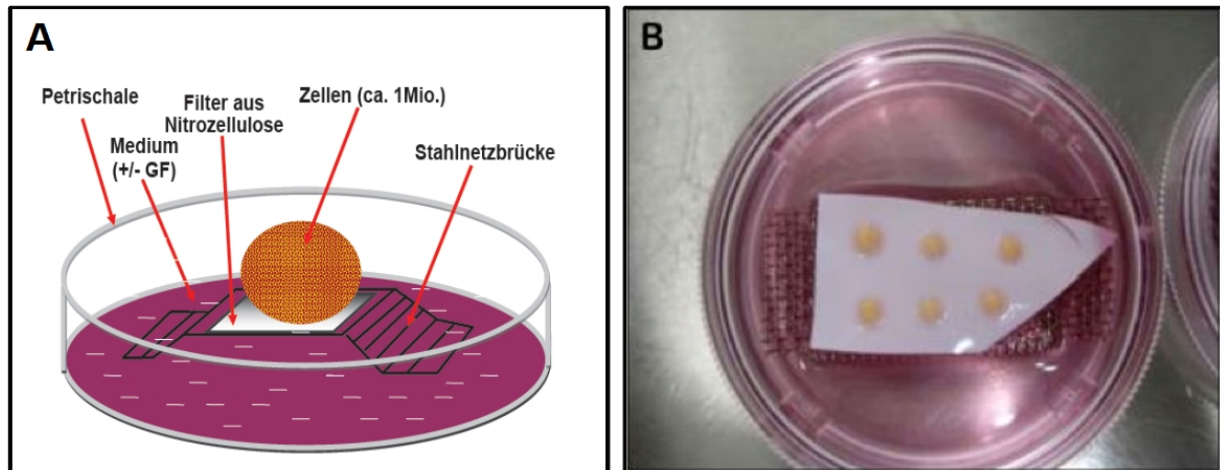


Abb. 3: (A) Grafische Darstellung des 3D-HD-Massenkulturmodells. (B) Photographische Aufnahme von 3D-HD-Massenkulturen in Petri-Schale mit Medium unter Lichtmikroskop (Lupenvergrößerung) aus Schneider, P.R.A. (Schneider, P. R. A., 2012)

3.2.6 Western-Blot-Analyse

Für die Auswertung der Zellkulturen mittels Western-Blot-Analyse wurden die Zellen in der Kulturflasche zunächst mit HANKS-Lösung gespült und im Anschluss mit Lysismix (Lysispuffer, PMSF und Pepstatin) für 30 min. auf Eis inkubiert. Die Massenkulturproben wurden vorher entnommen, zerkleinert und einzeln in ein 200µl Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach jeweils 15 min. wurde mit der Pipette homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat nochmals mit der Pipette homogenisiert, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 10.000rpm und 4°C für 30 min. zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Das Zellpellet wurde verworfen.

Die Proteinbestimmung wurde anschließend nach dem Auftauen der Proben mittels „Bicinchonic Acid System“ durchgeführt, wobei BSA als Standart verwendet wurde. Daraufhin wurden die Proben mit 2- Mercaptoethanol und 5x-Sample-Buffer versetzt und für 10 min. auf einem Heizblock bei 95°C reduziert. Es folgte die Einstellung der Proben auf eine gleiche Gesamtproteinkonzentration von 500ng/ml.

Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte auf 5 – 12% SDS-Polyacrylamidgelen und einem 4% Sammelgel erst für 15 min. bei 80V und dann für

60 min. bei 120V. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mittels Transblot – Elektrophorese – Apparatur (Biorad, München) für 1h bei 120V auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Membranen wurden nach dem Transfer zum Blocken von unspezifischen Bindungen für 2h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit Blocking-Buffer versetzt. Es folgte im Anschluss die Inkubation mit Primärantikörper über Nacht im Kühlschrank bei 4°C, das dreimalige jeweils 10-minütige Spülen mit Blocking-Buffer zur Entfernung des Primärantikörpers und die Inkubation des Sekundärantikörpers für 1,5h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Dieser wurde anschließend wiederum durch dreimaliges jeweils 10-minütiges Spülen mit 0,1M Tris-Buffer entfernt. Zum Nachweis der spezifischen Epitop-Antikörper-Bindungen wurden die Membranen mit BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat/Nitro-Blue-Tetrazolium) Solution im Dunkeln entwickelt, die als Substrat für die Alkaline-Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper dient. Die Nitrozellulose-Membranen mit den entwickelten Proteinbanden wurden schließlich eingescannt (Bio-Rad Laboratories Inc. CA., USA), die Bilder digital gespeichert und der densitometrischen Auswertung zugeführt.

3.2.7 Densitometrie

Die semi-quantitative Auswertung der Immunoblotergebnisse erfolgte computergestützt mittels densitometrischer Messung der von dem entsprechenden Antikörper markierten Proteinbanden auf der Nitrozellulose-Membran (ImageJ, Open Source, <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

3.2.8 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Zellen in Monolayer-Kultur wurden mit PBS gespült und zur Fixation 30 min. mit Karnovsky Lösung bedeckt. Nach anschließendem Ablösen der Zellen mit einem sterilen Zellschaber wurde die so gewonnene Zellsuspension bei 5000rpm für 5 min. zentrifugiert. Die Zellen in HD-Massenkultur wurden als Ganzes mit Karnovsky-Lösung fixiert. Danach wurde das Zellpellet mit 1%iger Osmiumtetroxid (OsO_4)-Lösung in Phosphatpuffer fixiert und anschließend mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Daraufhin folgten die Einbettung in Epon und das Schneiden der Probe mit einem

Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert, Heidelberg). Die Schnitte wurden so dann mit 2%igem Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert und mit einem Zeiss EM 10 und Zeiss EM 900 Transmissionselektronenmikroskop analysiert. Die gewonnenen mikroskopischen Aufnahmen wurden digital gespeichert.

3.2.9 Immunelektronenmikroskopie (IEM)

Die entnommenen Zellen in Monolayer-Kultur wurden zweimal à 3 min. mit PBS gespült und anschließend mit 4 ml 3%igem Paraformaldehyd und 0,25%igem Glutaraldehyd für 30 min. fixiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem sterilen Zellschaber abgelöst, in Eppendorftubes überführt und bei 5000rpm für 5 min. zentrifugiert. Nach erneutem Spülen mit PBS wurde die so gewonnene Zellsuspension in 200µl PBS suspendiert und abermals zentrifugiert. Die Zellen in HD- Massenkultur wurden als Ganzes entnommen und wie oben beschrieben gespült und fixiert. Die Zellpellets wurden darauf folgend mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Es folgte die Einbettung in ein 50%/50% LR White/Ethanol-Gemisch, das nach 24h und zweimaligem Wechseln des Gemisches durch 100% LR White ersetzt wurde. Die Proben wurden danach in neue Tubes überführt, auf Eis gelagert und mit LR White unter Zugabe eines Accelerators eingebettet. Die Proben polymerisierten über Nacht im Kühlschrank, wurden am nächsten Tag entnommen und getrocknet und anschließend ultradünn geschnitten. Die Schnitte wurden danach wie folgt behandelt:

- 1) 1% BSA bei RT für 30 min.;
- 2) testikuläre Chondroitinase (500 U/ml) für 5 min. zur Freilegung der Epitope;
- 3) PBS1% / BSA 0,5% / Tween20 für 5 min. bei RT;
- 4) Primärantikörper (1:50 in PBS1% / BSA0,5% / Tween20 über Nacht bei 4°C;
- 5) Spülen mit PBS1% / BSA0,5% / Tween20 für 5 min. bei RT;
- 6) Sekundärantikörper (1:50 in PBS1% / BSA0,5% / Tween20) für 30 min. bei RT;
- 7) Spülen, danach 5 min. bei RT;
- 8) Kontrastierung mit 1% tannic acid für 20 min. bei RT, mit Osmium für 10 min. bei RT und mit 2% Uranylacetat für 30 min. bei RT

Nach erneutem Spülen wurden die Schnitte unter einem Transmissionsmikroskop (Zeiss, EM 900) analysiert. Die gewonnenen mikroskopischen Aufnahmen wurden digital gespeichert.

3.2.10 Immunfluoreszenz (IF)

Die auf Chamberslides kultivierten Zellen wurden entnommen, dreimal mit PBS gespült und für 10 bis 20 min. mit Methanol fixiert. Nach erneutem dreimaligem Spülen mit PBS auf dem Schüttler für jeweils 5 min. wurden sie anschließend mit PBS+1%BSA für 30 min. inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit Primärantikörper in einer 1:30 Verdünnung mit 1%igem PBS+BSA in einer Feuchtkammer bei 37°C für 1 – 2h. Die Zellen wurden dann wie oben erwähnt abermals gespült und anschließend mit Sekundärantikörper in einer 1:50 Verdünnung mit 1%igem PBS+BSA für 2h in einer Dunkelfeuchtkammer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Spülvorgang mit PBS im Dunkel wurden die Zellen mit Mowiol abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica) untersucht.

3.2.11 Von Kossa Färbung

Zum Nachweis mineralisierter extrazellulärer Matriceinlagerungen wurden die Zellkulturen mittels Von Kossa Färbung untersucht. Nach Entnahme wurden die Zellen zunächst mit Methanol für 15 min. fixiert. Nach zweimaligem Spülen à 10 min. mit Aqua dest. folgte die Inkubation der Zellkulturen mit Silbernitratlösung für 1h im Dunkeln und anschließend zweimaligem Spülen à 3 min. mit Aqua dest. Darauf folgend wurden die Zellkulturen mit Pyrogallussäure (1, 2, 3-Trihydroxybenzene) für 5 min. inkubiert, mit Aqua dest. für 3 min. gespült und mit 5%iger Natrium-Thiosulfat-Lösung für 5 min. fixiert. Nach schließlich zweimaligem Spülen à 3 min. mit Leitungswasser wurden die Zellen zur Darstellung der Zellkerne mit Maygrünwald-lösung für 5 min gegengefärbt. Bei positiver Färbung werden mineralische Bestandteile intensiv schwarz angefärbt.

3.2.12 Oil-Red-O Färbung

Zum histologischen Nachweis von Lipiden wurde Oil-Red-O Färbung an den entnommenen Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellkulturen zunächst mit gut gekühltem 4%igem Formalin für 2 min. bei -20°C fixiert, anschließend mit eiskaltem 50%igem Ethanol gespült, danach mit 0,2%iger Oil-Red-O-Lösung für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert, nochmals mit 50%igem Ethanol gespült und schließlich mit Aqua dest. für 1 min. gewaschen. Bei positivem Nachweis werden Lipide rötlich angefärbt.

3.2.13 Alcian-Blau Färbung

Zum histologischen Nachweis von extrazellulären knorpelspezifischen Proteoglykanen (CSPG) wurden die 3D-HD-Massenkulturen entnommen, in Tissue-Tek eingebettet, umgehend mit flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bei -80°C gelagert. Mittels Kryomikrotom wurden von den Zellproben 5 – 8µm dicke Schnitte angefertigt, diese so-dann auf Superfrost plus Objektträger aufgebracht, bei Raumluft getrocknet und für 20 Sekunden mit Aceton fixiert. Nach anschließender Spülung mit Aqua dest. wurden die Zellproben mit Alcian-Blau-Lösung (0,05% Alcian-Blau in 3% Essigsäure bei pH 1,5 plus 0,3 M MgCl₂) für 2h inkubiert, danach mit Leitungswasser für 2 min. gewaschen, anschließend mit Aqua dest. gespült und mit Nuclear-fast-red-Lösung für 5 min. gegengefärbt. Es folgte das Spülen der Proben mit Leitungswasser für 1 min., die Entwässerung mittels 95%igem Alkohol mit zweimaligem Wechseln des Alkohols à 3 min., das Reinigen in Xylen und schließlich die Eindeckung der Zellproben mittels Eindeckmedium. Als Ergebnis werden saure sulfatierte Proteoglykane blau, Zellkerne pink bis rötlich und Zytoplasma blass pink angefärbt.

3.2.14 PKH- Membranfärbung

3.2.14.1 In Monolayer-Kultur

Die Zellen wurden mit dem ‚PKH Membran Labeling Kit‘ (Sigma) angefärbt. Dabei wurden MSZ mit dem roten fluoreszierenden Membranfarbstoff PKH26 markiert und PCh mit dem grünen Farbstoff PKH67. Hierzu wurden zunächst zur Entfernung der Mediumsreste jeweils ca. 120.000 Zellen in Suspension mit PBS gespült und

anschließend bei 400g für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde danach verworfen. Nach dreimaligem Spülvorgang mit zwischengeschalteter Zentrifugation wurden die Zellen in 200 µl ‚diluent C‘ resuspendiert und mit 200 µl PKH-Farbstoff mit der Konzentration 4×10^{-6} M vermischt. Nach 5-minütiger Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 400 µl FCS gestoppt. Nach Resuspension der nun angefärbten Zellen in 1 ml normalem Medium wurden sie in ein neues Tube transferiert und bei 400g für 10 min. zentrifugiert, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Schließlich wurden sie dreimal mit 10 ml normalem Zellkulturmedium gespült. Zur Überprüfung der Anfärbung wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Danach wurden sie in Monolayer-Kultur ausgesät und unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert.

3.2.14.2 In 3D-High-Density Massenkultur

MSZ und PCh wurden wie oben für Monolayer-Kultur beschrieben mit fluoreszierendem PKH-Membranfarbstoff (MSZ rot, PCh grün) angefärbt und anschließend im Verhältnis 50:50 in Suspension gebracht und gut vermischt. Daraus wurden 3D-HD-Massenkulturen wie oben beschrieben hergestellt. Nach 3, 7 und 14 Tagen Kultivierung mit normalem Zellkulturmedium oder chondrogenem Differenzierungsmedium wurden die Proben entnommen, kryofixiert und bei -80 °C eingelagert. Später wurden mittels Kryomikrotom 5 – 8 µm dicke Schnitte angefertigt und diese unter Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Mikroskopieraufnahmen wurden digital bearbeitet und gespeichert.

3.2.15 Charakterisierung der isolierten kaninen primären Chondrozyten (kPCh)

Um sicherzustellen, dass es sich bei den isolierten Chondrozyten auch tatsächlich um primäre Chondrozyten handelt, wurden zum Nachweis knorpeltypischer Marker die isolierten Zellen der Immunfluoreszenzanalyse unterzogen.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse zeigten deutlich, dass alle isolierten Zellen positiv für das knorpelspezifische Protein Kollagen Typ II sowie wichtige knorpeltypische Zellmembran- und Zytoskelettproteine wie β_1 -Integrin, β -Actin und α_1 -Actinin waren (Abb. 4). Damit wurde nachgewiesen, dass es sich bei der isolierten

und im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellpopulation um genuin primäre Chondrozyten handelt.

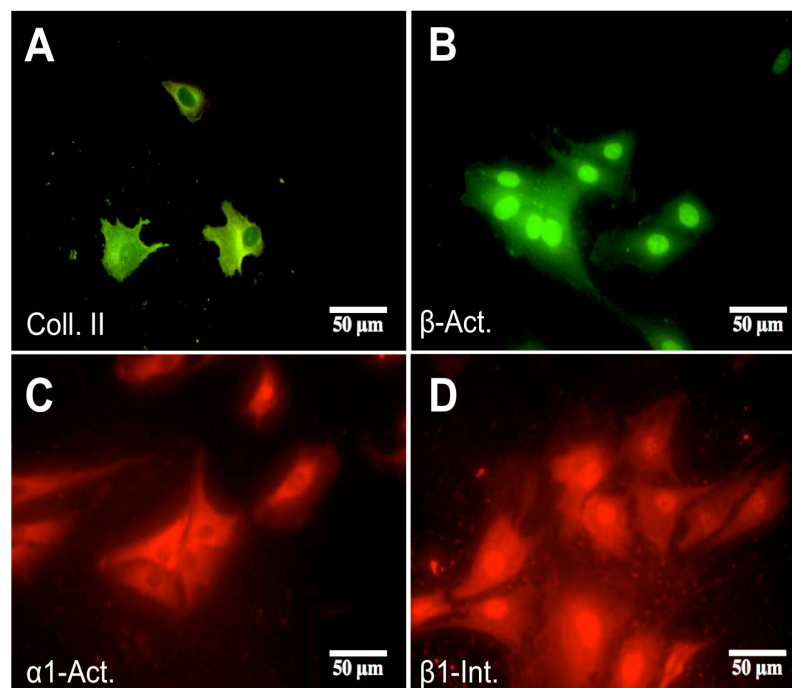


Abb. 4: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der isolierten kaninen primären Chondrozyten (kPCh). Alle Zellen sind positiv für das knorpelspezifische Protein Kollagen Typ II (A) sowie wichtige chondrale Membran- und Zytoskelettproteine wie β -Actin, α_1 -Actinin und β_1 -Integrin (B – D)

3.2.16 Charakterisierung der isolierten kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) aus dem Knochenmark

Das *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) definierte 2006 in einem Positionspapier drei Minimalkriterien, um multipotende mesenchymale Stammzellen zu charakterisieren (Dominici et al., 2006). Erstens müssen MSZ in der Lage sein, sich unter Standardbedingungen an Kulturflaschen zu adhären. Zweitens muss > 95% der MSZ-Population bestimmte Zelloberflächenmarker exprimieren wie z.B. CD105, CD90, CD73, während < 2% der Population hämatopoetische Zelloberflächenmarker wie z.B. CD45, CD34, HLA-DR exprimieren darf. Drittens müssen die Zellen fähig sein, sich *in vitro* unter Differenzierungsbedingungen zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten zu differenzieren (Dominici et al., 2006). Um diesen Kriterien gerecht zu werden, wurden

die isolierten kaninen mesenchymalen Stammzellen dementsprechend charakterisiert und differenziert, wobei das erste Kriterium durch die Kultivierung der Zellen in Monolayer-Kultur bereits erfüllt wurde.

3.2.16.1 Nachweis Stammzell-spezifischer Zelloberflächenmarker mittels Immunfluoreszenz (IF)

Die isolierten kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) wurden mittels Immunfluoreszenz-Analyse in der oben beschriebenen Weise auf ihre stammzell-spezifischen Zelloberflächenmarker untersucht. Wie in der Abbildung 5 ersichtlich, zeigten sich die Zellen durchweg stark positiv für die Stammzellmarker CD105⁺ und CD90⁺ und negativ für die hämatopoetischen Zelloberflächenmarker CD45⁻ und CD34⁻.

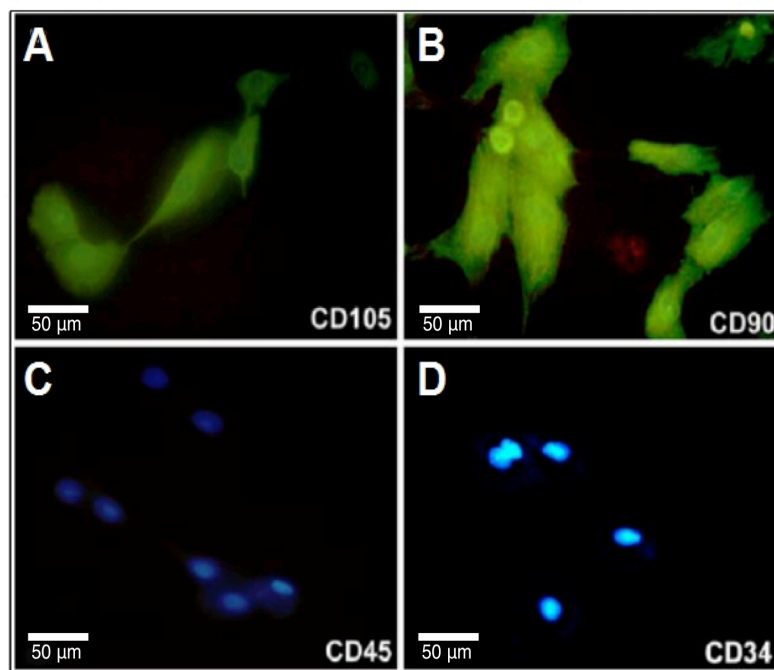


Abb. 5: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der isolierten kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) aus dem Knochenmark. Die Zellen zeigen ein stark positives Signal für Stammzell spezifische Marker CD105⁺, CD90⁺ (A, B) und ein negatives Signal für hämatopoetische Marker CD45⁻, CD34⁻ (C, D). Modifiziert nach Csaki et. al. (Csaki et al., 2007).

3.2.16.2 Differenzierung der isolierten kMSZ zu Osteoblasten

Die osteogene Differenzierung der isolierten kaninen MSZ wurde in Monolayer-Kultur auf Six-Well-Plates wie bei Pittenger et al. beschrieben durchgeführt (Pittenger et al., 1999). Es wurden 20.000 (Kontrolle) bis 60.000 (Induziert) Zellen pro Well ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Hälfte der Zellkulturen wurde mit osteogenem Differenzierungsmedium über 21 Tage inkubiert und die andere Hälfte mit normalem Zellkulturmedium mit 10% FCS über denselben Zeitraum. Jeden dritten Tag erfolgte Mediumwechsel. Das osteogene Differenzierungsmedium setzte sich wie folgt zusammen: DMEM Basismedium mit Natriumpyruvat, 1000mg/L Glucose und Pyroxidine, 10% FCS, Penicillin/Strepto-mycin Lösung (10000 IU/10000 IU/100ml), 10^{-7} M Dexamethason, 10mM b-Glycerophosphat und 50mM Ascorbat-2-Phosphat. Am Tag 21 wurden die Zellkulturen entnommen und der histochemischen Analyse zum Nachweis osteogener Charakteristika zugeführt.

Unter dem Lichtmikroskop (Leica) zeigte sich deutlich (Abb. 6), dass die mit osteogenem Differenzierungsmedium induzierten MSZ ihren polymorphen Phänotyp von spindelförmig, kuboidal bis polygonal und sternförmig beibehielten. Teilweise konnte die Bildung von kleinen Knötchen beobachtet werden. Die neu gebildete extrazelluläre Matrix war positiv für Von Kossa Färbung, womit Ablagerung von mineralischen Bestandteilen in der Matrix angenommen werden kann. Die Kontrollzellen waren z.T. stark überwuchert, zeigten eine fibroblastenähnliche Morphologie und waren negativ für Von Kossa Färbung (Abb. 6).

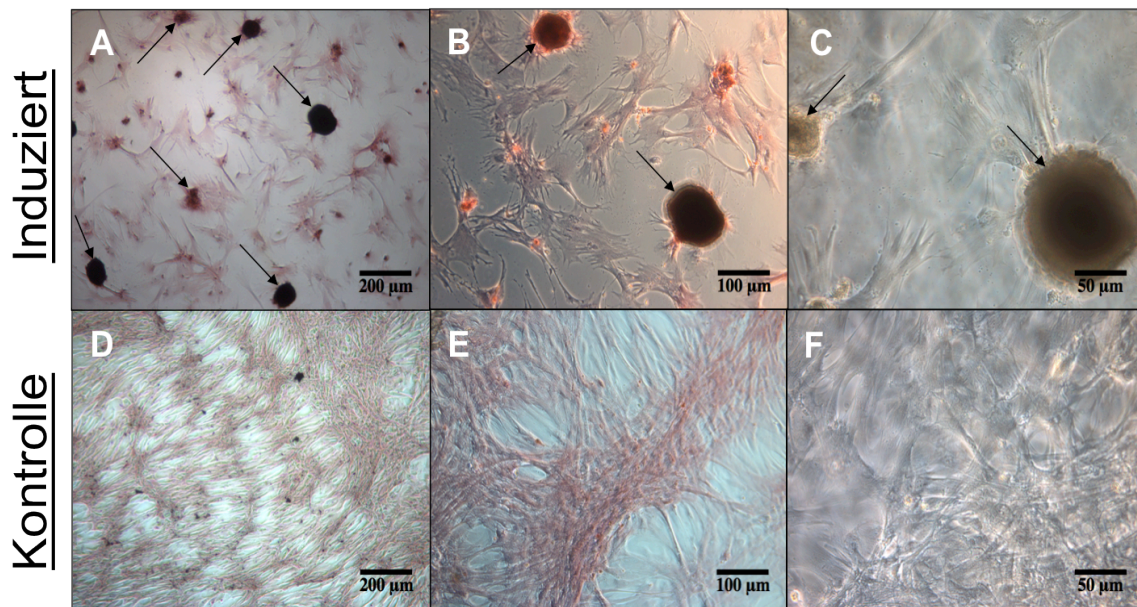


Abb. 6: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen osteogen induzierter kaniner MSZ (A-C) und unbehandelter MSZ (D-F) nach 21 Tagen in Monolayer-Kultur mit von Kossa Färbung und May-Grünwald-Färbung. Knötchenbildung und mineralische Einlagerungen in der EZM durch positive von Kossa Färbung sind in der induzierten MSZ-Kultur deutlich zu erkennen (Pfeile). Die MSZ der Kontrollkultur zeigen fibroblastenartige Morphologie und sind negativ für von Kossa Färbung.

Die elektronenmikroskopische Analyse der osteogen induzierten MSZ zeigte vitale Zellen mit einem prominenten Nukleus und einem hohen Anteil von Euchromatin, vielen stoffwechselaktiven Zellorganellen wie Mitochondrien, rauem ER und Golgiapparat (Abb. 7). In der gut organisierten EZM waren Bündel von Fibrillen nachzuweisen (Abb. 7). In der unbehandelten Kontrollkultur ließen sich sowohl vitale als auch deformierte Zellen nachweisen. Es war kein geschlossener Zellverband zu erkennen. Die Zellen zeigten apoptotische Eigenschaften wie z.B. Schrumpfung der Zelle, Kondensierung und Fragmentierung des Nukleus (Pyknose und Karyorrhexis) und Ein- und Abschnürungen der Zellmembran. Die EZM war aufgelockert und desorganisiert (Abb. 7).

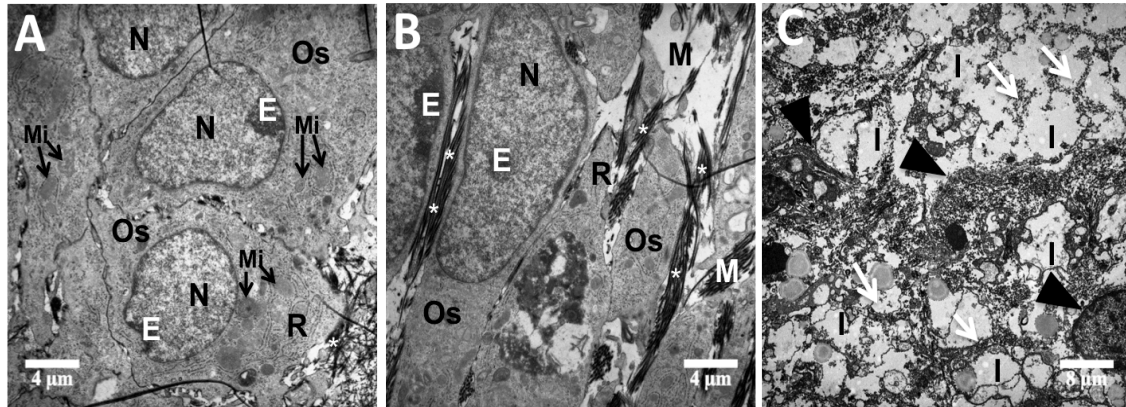


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen osteogen induzierter kaniner MSZ (A - B) und unbehandelter MSZ (C) nach 21 Tagen in Monolayer-Kultur. Vitale und stoffwechselaktive osteoblastoide Zellen (**Os**) mit großem Nukleus (**N**), prominentem Nukleolus mit Euchromatin (**E**), Mitochondrien (**Mi**), rER (**R**) und Golgi-Apparat in einem organisierten Zellverband mit dicken Fibrillenbündeln (*) in der EZM (**M**) sind in den induzierten MSZ-Kulturen deutlich zu erkennen (A - B). Nekrotische und abgerundete Zellen (**Pfeilspitzen**) ohne strukturelle Architektur mit reichlich Zelltrümmern (**Pfeile**) im Interzellularraum (**I**) und ohne erkennbaren Nachweis von Fibrillenbündeln sind in der unbehandelten Kontrollkultur zu sehen (C).

Um die osteogene Differenzierung der MSZ auf der Proteinebene genauer zu untersuchen, wurden die Kulturen wie bereits oben beschrieben der Westernblot-Analyse unterzogen. Das in der EZM des Knochengewebes vorkommende Kollagen Typ I war in der mit osteogenem Differenzierungsmedium induzierten MSZ-Kultur ähnlich stark exprimiert wie in der positiven Kontrollkultur aus primären Osteozyten (Abb. 8 A-B). Gleiches traf auch auf das Membranadhäsions- und Signaltransduktionsmolekül $\beta 1$ -Integrin und den Transkriptionsfaktor der Osteogenese Cbfa-1 zu (Abb. 8 A-B). In der negativen Kontrollkultur mit unbehandelten MSZ konnte keine Expression von Kollagen Typ I festgestellt werden (Abb. 8 C). Die Expression von $\beta 1$ -Integrin und Cbfa-1 war in geringer Konzentration nachweisbar (Abb. 8 C). Das Kontrollprotein β -Aktin, das in allen eukaryoten Zellen expremiert wird, wurde in allen Zellkulturen nachgewiesen (Abb. 8).

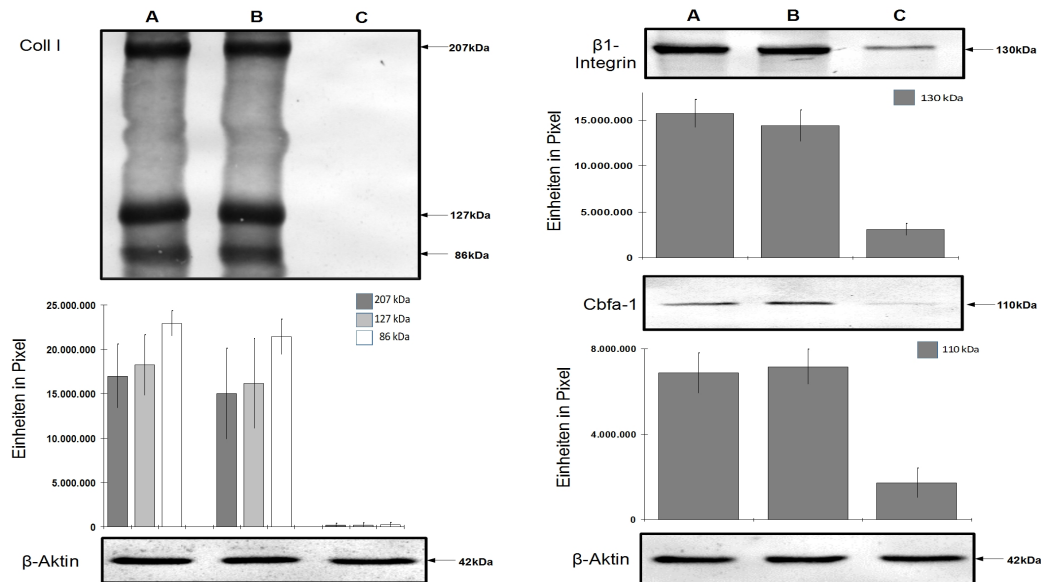


Abb. 8: Westernblot-Analyse kaniner MSZ mit/ohne osteogene/r Induktion und primärer Osteozyten nach 21 Tagen in Monolayer-Kultur. Deutliche Expression von Kollagen Typ I, $\beta 1$ -Integrin und Cbfa-1 in der positiven Kontrollkultur aus primären Osteozyten (A) und osteogen induzierter MSZ-Kultur (B) sichtbar. (A): Primäre Osteozyten; (B): MSZ nach Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium; (C): MSZ unbehandelt.

3.2.16.3 Differenzierung der isolierten kMSZ zu Adipozyten

Die adipogene Differenzierung derselben MSZ wurde ebenfalls in Monolayer-Kultur auf Six-Well-Plates durchgeführt (Pittenger et al., 1999). Es wurden 20.000 bis 60.000 Zellen pro Well ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zur Hälfte für 72h mit adipogenem Induktionsmedium inkubiert bestehend aus DMEM Basismedium mit Natriumpyruvat, 1000mg/L Glucose und Pyroxidine, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin Lösung (10000 IU/10000 IU/100ml), 1mM Dexamethason, 0,2 mM Indomethacin, 0,1 mg/ml Insulin und 1mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX). Danach wurden diese Zellen wiederum für 24h mit adipogenem Erhaltungsmedium inkubiert bestehend aus DMEM Basismedium mit Natriumpyruvat, 1000mg/L Glucose und Pyroxidine, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin Lösung (10000 IU/10000 IU/100ml) und 0,1 mg/ml Insulin. Nach viermaliger Wiederholung des Behandlungszyklusses wurden die Zellen abschließend für eine Woche in adipogenem Erhaltungsmedium inkubiert. Die andere Hälfte der Zellen diente als Negativkontrolle und wurde über den gesamten Zeitraum in normalem Zellkulturmedium mit 10% FCS kultiviert. Nach Abschluss des Differenzierungszeitraums am Tag 23 wurden die Zellen entnommen und der histologischen und immunhistochemischen Untersuchung zum Nachweis adipogener Charakteristika zugeführt.

Die lichtmikroskopische Auswertung (Leica) zeigte bei adipogen induzierten MSZ eine fibroblastäre, spindelförmige und polymorphe Zellmorphologie, starke Konfluenz der Zellen zu Kolonien und Ansammlung von neu gebildeten, intrazellulär überwiegend perinukleär gelegenen Lipidvakuolen durch positive Oil-Red-O Färbung (Abb. 9). MSZ der Kontrollkultur waren ebenfalls fibroblastenartig und teilweise stark überwuchert (Abb. 9). In den Zellen ließen sich keine Lipidvakuolen durch Oil-Red-O Färbung nachweisen (Abb. 9).

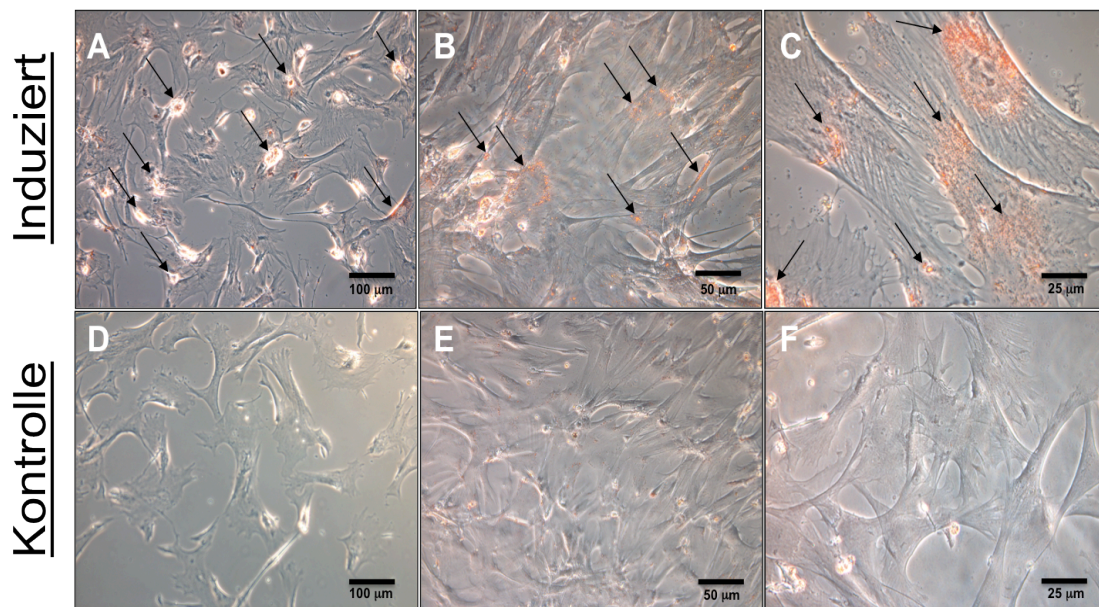


Abb. 9: Phasenkontrastmikroskopische Darstellung adipogen induzierter kMSZ (A – C) und unbehandelter Kontroll-MSZ (D – F) nach 23 Tagen in Monolayer-Kultur mit Oil-Red-O Färbung. Positiver intrazellulärer Nachweis von mit Oil-Red-O gefärbten Lipidvakuolen (**A - C Pfeile**) ist in der induzierten MSZ-Kultur deutlich erkennbar. Die Kontrollkultur zeigt eine fibroblastenähnliche Morphologie (E) und ist negativ für Oil-Red-O Färbung (**D - F**).

Auf ultrastruktureller Ebene wurden die morphologischen Eigenschaften der adipogen-induzierten MSZ mittels Transmissionselektronenmikroskopie eingehender untersucht. Dabei waren die großen intrazellulären Lipidtröpfchen besonders auffällig (Abb. 10 A, B). Die induzierten MSZ zeigten einen adipozytoiden Phänotyp mit gut entwickelten und ausgeprägten Zellorganellen, insbesondere Mitochondrien, die auf einen hohen zellulären Metabolismus hindeuten. Darüber hinaus waren die Zellen in einer gut organisierten EZM eingebettet mit auffällig hohem Anteil von Fibrillenbündeln (Abb. 10 A). Die MSZ der Kontrollkultur zeigten ein polymorphes Bild bestehend aus

teils vitalen teils apoptotischen Zellen in einem lockeren Zellverband ohne Nachweis von intrazellulären Fettvakuolen (Abb. 10 C).

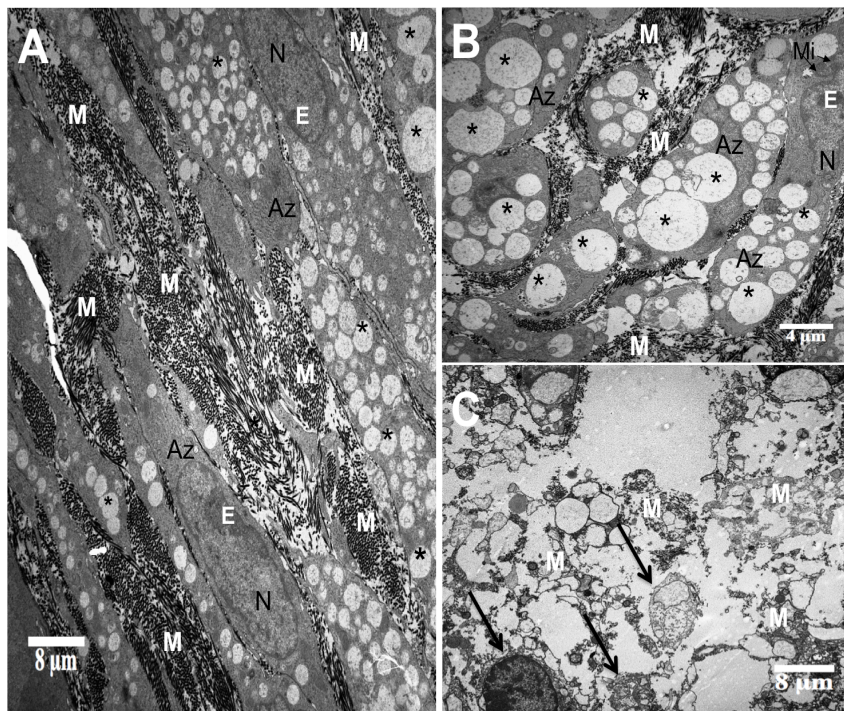


Abb. 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen adipogen induzierter kMSZ (A, B) und unbehandelter Kontroll-kMSZ (C) nach 23 Tagen in Monolayer-Kultur. Deutlicher Nachweis von reichlich intrazellulären Fettvakuolen (*) in induzierten MSZ erkennbar (A, B); Die Zellen zeigen eine längliche adipozytoide Morphologie (Az) mit einem großen Nukleus (N), hoher Konzentration von Euchromatin (E) und stoffwechselaktiven Zellorganellen wie z. B. Mitochondrien (Mi), raues ER und Golgi-Apparat eingebettet in einem gut organisierten Zellverband (A) mit dicken Fibrillenbündeln in der EZM (M). (C): Die Kontrollkultur zeigt nekrotische Zellen (Pfeil) ohne Nachweis von Fettvakuolen in einem locker organisierten Verband mit aufgelockerter EZM (M).

Die Westernblot-Analyse zeigte starke Expression von extrazellulären Matrixbestandteilen des Fettgewebes wie Kollagen Typ I und Adiponektin, das meist vorkommende Protein im Fettgewebe, in der adipogen induzierten MSZ-Kultur, die vergleichbar ist mit der der positiven Kontrollkultur aus primären Adipozyten (Abb. 11 A, B). Ebenso deutlich traf dies für β_1 -Integrin zu (Abb. 12 A, B). Die Hochregulation des für Adipozyten spezifischen Transkriptionsfaktors PPAR- γ in der induzierten MSZ-Kultur war ebenfalls erkennbar wie in der Zellkultur aus primären Adipozyten (Abb. 12 A, B).

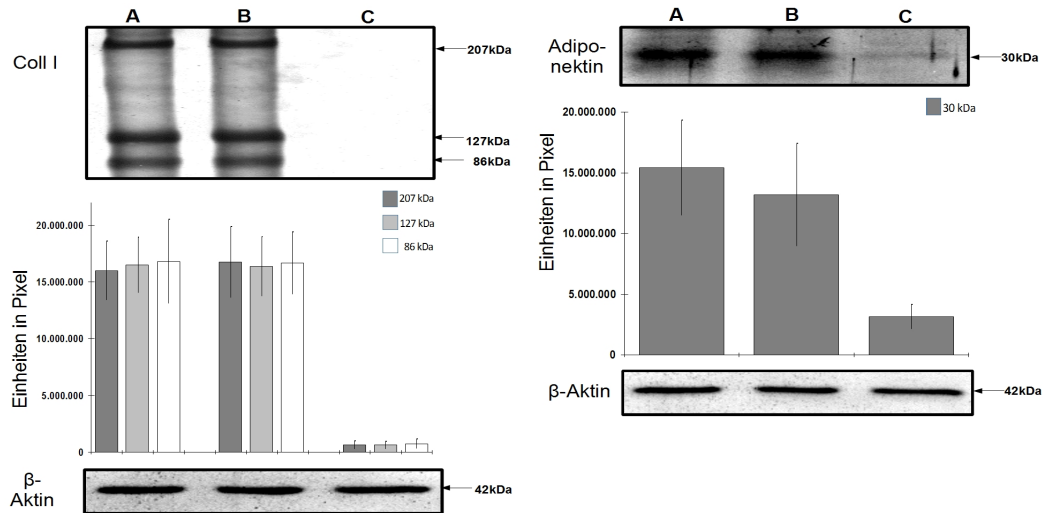


Abb. 11: Westernblot-Analyse von fettspezifischen extrazellulären Matrixproteinen Kollagen Typ I und Adiponektin in kaninen MSZ mit oder ohne adipogene/r Induktion und primären Adipozyten nach 23 Tagen in Monolayer-Kultur. Deutliche Expression von Kollagen Typ I und Adiponektin in primären Adipozyten (A) und adipogen induzierten MSZ (B) sichtbar. **(A):** Primäre Adipozyten; **(B):** MSZ nach Kultivierung mit adipogenem Differenzierungsmedium; **(C):** MSZ unbehandelt.

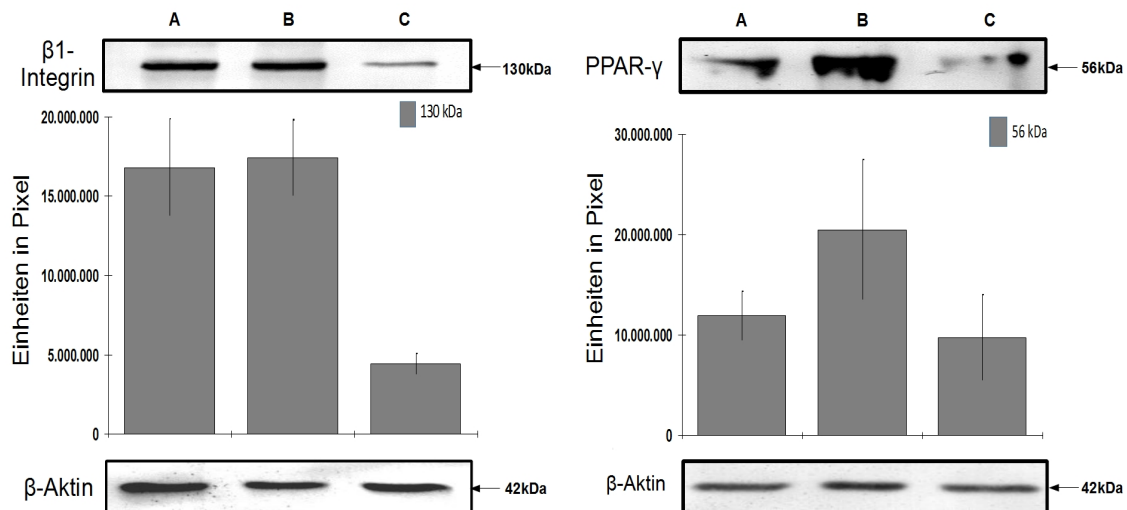


Abb. 12: Westernblot-Analyse von β_1 -Integrin und PPAR- γ in kaninen MSZ mit oder ohne adipogene/r Induktion und primären Adipozyten nach 23 Tagen in Monolayer-Kultur. Deutliche Expression beider Proteine in primären Adipozyten (A) und induzierten MSZ (B) erkennbar, geringe Proteinkonzentration in unbehandelten MSZ (C). **(A):** Primäre Adipozyten; **(B):** MSZ nach Kultivierung mit adipogenem Differenzierungsmedium; **(C):** MSZ unbehandelt.

In der negativen Kontrollkultur aus unbehandelten MSZ konnte hingegen keine Expression von Kollagen Typ I und nur eine schwache Expression von Adiponektin festgestellt werden (Abb. 11 C). β 1-Integrin und PPAR- γ konnten in geringen Mengen nachgewiesen werden (Abb. 12 C). Das ubiquitär vorkommende Zytoskelettprotein β -Aktin lie β sich in allen Kulturen unverändert nachweisen (Abb. 11, 12).

3.2.16.4 Differenzierung der isolierten kMSZ zu Chondroblasten

Die chondrogene Differenzierung der isolierten kMSZ erfolgte in 3D-High-Density Massenkultur (Csaki et al., 2007; Shakibaei, 1998). Die Zellkulturen wurden \ddot{u} ber einen Zeitraum von 14 Tagen mit chondrogenem Differenzierungsmedium inkubiert bestehend aus DMEM Basismedium mit Natriumpyruvat, 1000mg/L Glucose und Pyroxidine, D-(+)-Glukose 0,35g/100ml, ITS+1 Mediumzusatz (10mg/ml Insulin, 5,5mg/ml Transferrin, 5ng/ml Selenium, 0,5 mg/ml bovines Albumin, 4,7 mg/ml Linols \ddot{a} ure, 0,1 mM Ascorbat-2-Phosphat, 10^{-7} M Dexamethason und Penicillin/Streptomycin L \ddot{o} sung (10000 IU/10000 IU/100ml) (Csaki et al., 2007; Pittenger et al., 1999). Jeden dritten Tag erfolgte Mediumwechsel. Vor jedem Mediumwechsel wurden dem Differenzierungsmedium 10 ng/ml frisches hTGF- β 1 zugef \ddot{u} gt. Die Negativkontrollen wurden in normalem Zellkulturmedium mit 10% FCS kultiviert. Die 3D-HD-Massenkulturen wurden nach Abschluss des Differenzierungszeitraums entnommen und zur Untersuchung der chondrogenen Eigenschaften mittels histochemischen Methoden (Alcian-Blau F \ddot{a} rbung, TEM und Western Blot) analysiert. Ein St \ddot{u} ck natives Knorpelgewebe diente als Positivkontrolle und wurde ebenfalls kryofixiert, mittels Kryomikrotom geschnitten und mit Alcian Blau angef \ddot{a} rbt.

In der lichtmikroskopischen Aufnahme lie β sich bei den chondrogen induzierten MSZ-Massenkulturen in der EZM durchweg ein hoher Anteil knorpelspezifischer Proteoglykane (CSPG) durch deutliche Alcian-Blau F \ddot{a} rbung nachweisen vergleichbar mit nativem Knorpelgewebe in der Positivkontrolle (Abb. 13 A –B, E- F). Durch die Kondensation der Massenkultur lagen die Zellen dicht gepackt zusammen und waren in einer strukturierten Architektur angeordnet. Die unbehandelten MSZ-Massenkulturen

waren negativ für Alcian-Blau Färbung. Die Zellen waren locker angeordnet und zeigten keinen organisierten Aufbau (Abb. 13 C -D).

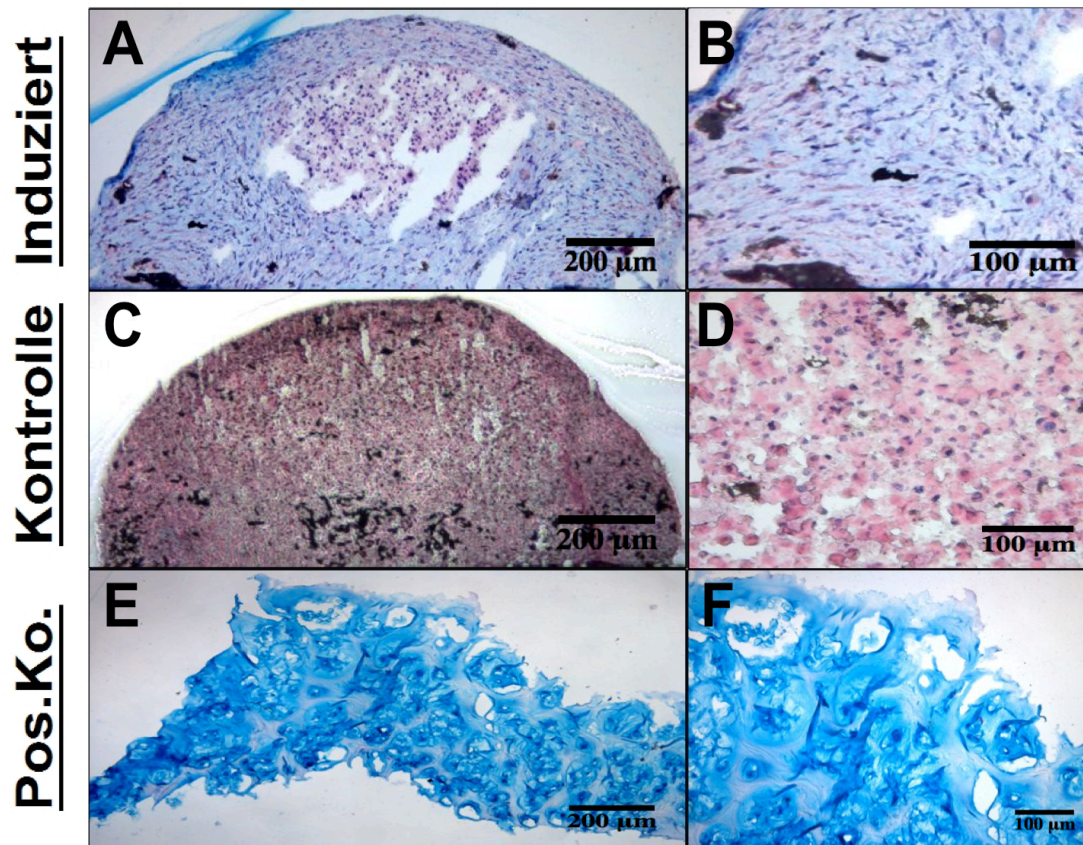


Abb. 13: Lichtmikroskopische Aufnahmen chondrogen induzierter kMSZ (A+B) und unbehandelter MSZ (C+D) nach 14 Tagen in 3D-HD-Massenkultur sowie nativen Knorpels (E+F) mit Alcian-Blau Färbung. Knorpelspezifische Proteoglykane (CSPG) in der EZM in induzierten MSZ (A+B) und nativem Knorpelgewebe (E+F) durch deutliche Alcian-Blau Färbung nachweisbar. Die Kontroll-Kultur aus unbehandelten kMSZ (C+D) ist negativ für Alcian-Blau Färbung.

Elektronenmikroskopisch zeigten die chondrogen induzierten MSZ eine chondroblastoide Morphologie mit runden oder ovalen, zum Teil paarweise gruppierten Zellen in der Mitte der Schnitte (Abb. 14 A, B). Sie wurden von mehreren äußeren Schichten länglicher fibroblastenartiger Zellen mit dicken extrazellulären Matrixfibrillen umgeben, die dem Perichondrium *in vivo* sehr ähneln (Abb. 14 A). Die chondroblastoiden Zellen mit großen Nuklei und einem hohen Anteil von Euchromatin, Mitochondrien, Golgi-Apparat und reichlich ER waren teilweise gefüllt mit Vesikeln, die auf eine hohe Syntheseaktivität der Zelle hindeuten. Sie waren eingebettet in eine hoch organisierte EZM mit einem Maschenwerk aus Fibrillenbündeln (Abb. 14 A, B). Hingegen

zeigten die MSZ der Kontrollkultur bereits apoptotische Merkmale wie Karyorrhexis und apoptotic bodies (Abb. 14 C). Die Zellen bildeten keinen geschlossenen Zellverband. In den interzellulären Räumen waren viel Zelltrümmer und wenig EZM nachzuweisen (Abb. 14 C).

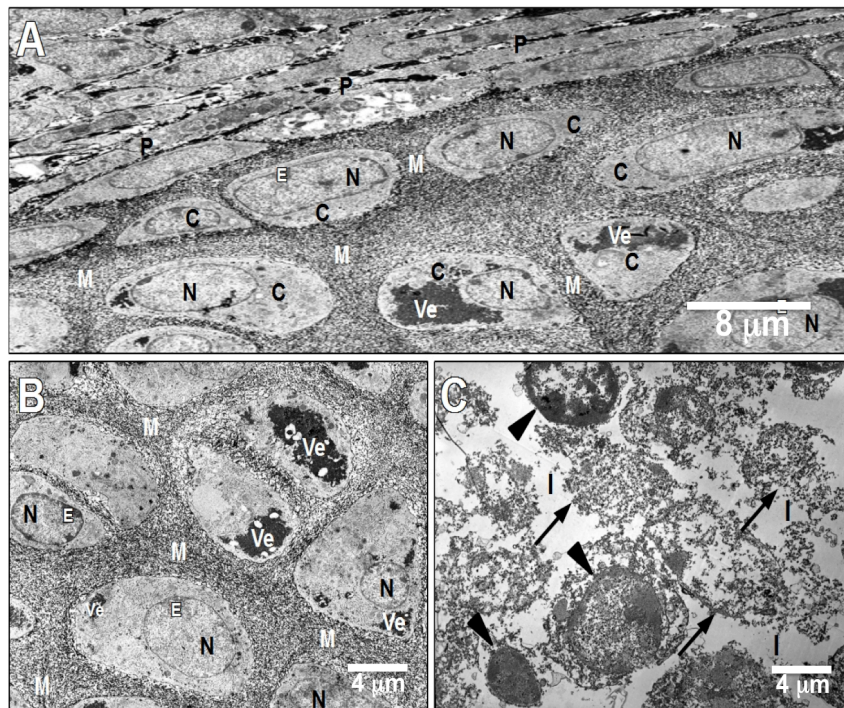


Abb. 14: (A)+(B): Elektronenmikroskopische Aufnahmen chondrogen induzierter kMSZ nach 14 Tagen in 3D-HD-Massenkultur. Die runden bis ovalen chondroblastoiden Zellen (C) mit großem Nukleus (N) und hohem Anteil von Euchromatin (E) sowie reichlich intrazellulären Vesikeln (Ve) sind eingebettet in einem Netzwerk aus extrazellulären Matrixfibrillen (M) umgeben von mehreren Schichten flacher fibroblastenartiger Zellen mit dicken EZM-Fibrillen, ähnlich dem Perichondrium *in vivo* (P). **(C): Unbehandelte kMSZ der Kontrollkultur nach 14 Tagen in 3D-HD-Massenkultur in der TEM-Aufnahme.** Die Zellen sind abgerundet (Pfeilspitzen) und zeigen apoptotische Merkmale wie apoptotic bodies, viel Zelltrümmer (Pfeile) und wenig EZM im Interzellularraum (I). Ein strukturierter Zellverband ist nicht zu erkennen.

Die Western-Blot-Analyse zeigte eine deutliche Produktion der extrazellulären Matrixproteine des Knorpelgewebes wie Kollagen Typ II und knorpelspezifische Proteoglykane (CSPG) in der chondrogen induzierten MSZ-Massenkultur und erwartungsgemäß in der positiven Kontrollkultur aus PCh (Abb. 15). In der unbehandelten MSZ-Kultur waren kein Kollagen Typ II und nur Spuren von CSPG feststellbar (Abb. 15).

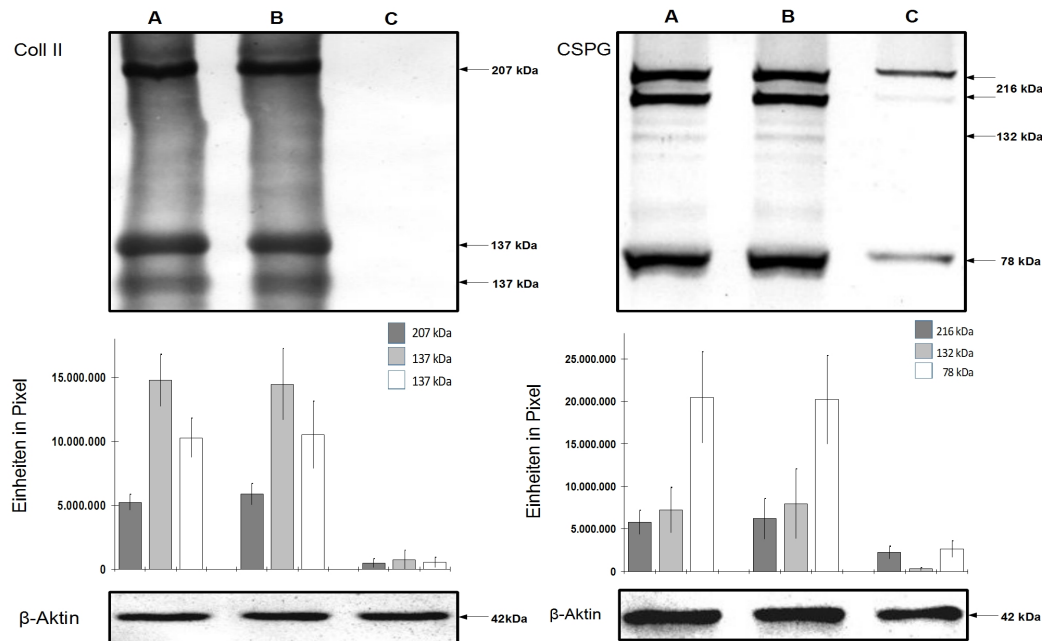


Abb. 15: Westernblot-Analyse von Kollagen Typ II und CSPG in kaninen MSZ mit oder ohne chondrogene/r Induktion und PCh nach 14 Tagen in 3D-HD-Massenkultur. Deutliche Expression von knorpelspezifischen extrazellulären Matrixproteinen Kollagen Typ II und CSPG in der positiven Kontrollkultur aus primären Chondrozyten (A) und der chondrogen induzierten MSZ-Kultur (B) erkennbar. **(A):** Primäre Chondrozyten; **(B):** MSZ nach Kultivierung mit chondrogenem Differenzierungsmedium; **(C):** Unbehandelte MSZ

Das Membranadhäsions- und Signaltransduktionsprotein $\beta 1$ -Integrin war in der induzierten MSZ-Kultur und der PCh-Kultur ebenfalls stark exprimiert, wohingegen die Proteinkonzentration in der unbehandelten MSZ-Kultur deutlich niedriger war (Abb. 16). Für das intrazelluläre Signaltransduktionsprotein der Chondrogenese Shc und den chondrogenen Transkriptionsfaktor Sox-9 wurde die gleiche Beobachtung gemacht (Abb. 16). In der induzierten MSZ-Kultur und der PCh-Kontrollkultur wurden sie hoch reguliert, wohingegen sie in der nicht induzierten MSZ-Kultur auffallend niedrig ausfielen (Abb. 16). Das House-keeping Protein β -Aktin war in allen Kulturen unverändert nachzuweisen (Abb. 15, 16).

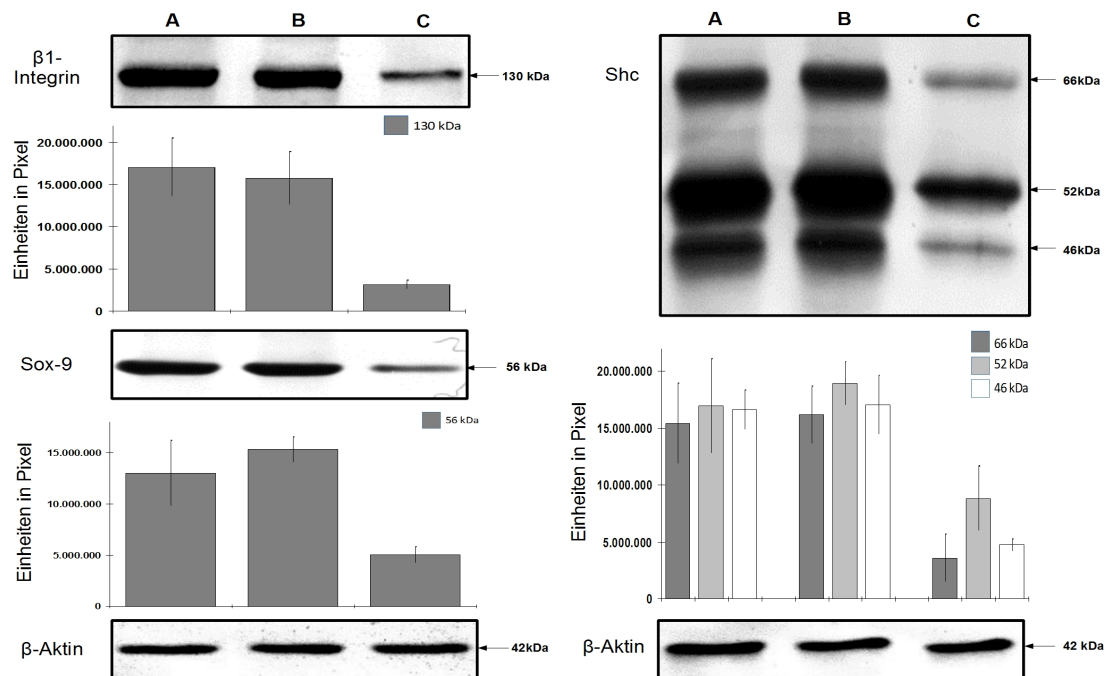


Abb. 16: Westernblot-Analyse von β_1 -Integrin, Shc und Sox-9 in kaninen MSZ mit oder ohne chondrogene/r Induktion und PCh nach 14 Tagen in 3D-HD-Massenkultur. Deutliche Expression von β_1 -Integrin, Shc und Sox-9 in der positiven Kontrollkultur aus primären Chondrozyten (A) und in der chondrogen induzierten MSZ-Kultur (B) erkennbar. **(A):** Primäre Chondrozyten; **(B):** MSZ nach Kultivierung mit chondrogenem Differenzierungsmedium; **(C):** Unbehandelte MSZ.

Die isolierten kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) aus dem Knochenmark konnten durch Kultivierung in Monolayer-Kultur, Immunmarkierung der stammzell-spezifischen Zelloberflächenmarker und Differenzierung der Zellen zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten allen Kriterien zur Charakterisierung der multipotenten Stammzellen gerecht und somit für weitere Versuche als mesenchymale Stammzellen (MSZ) eingesetzt werden.

3.2.17 Ko-Kultur aus kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) und primären Chondrozyten (kPCh)

3.2.17.1 In 3D- High-Density-Massenkultur mit verschiedenen Mischungsverhältnissen

Wie bereits oben beschrieben wurden 3D-HD-Massenkulturen hergestellt. Sie bestanden aus 100% MSZ, 100% PCh und den Ko-Kulturen aus MSZ und PCh im Verhältnis 90:10, 70:30 und 50:50. Die Massenkulturen wurden mit oder ohne Induktion mit

chondrogenem Differenzierungsmedium über 21 Tage *in vitro* kultiviert. Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage, wobei TGF- β 1 jeweils frisch hinzugefügt wurde. Nach 21 Tagen wurden die Massenkulturen entnommen und der histologischen und immunhistochemischen Studie mittels Transmissionselektronenmikroskopie, Immunelektronenmikroskopie und Western-Blot-Analyse zugeführt. Um die gleichmäßige Verteilung der beiden Zellpopulationen im 3D-HD-Massenkulturmodell nachzuweisen, wurden parallel dazu wie oben erwähnt die Zellen mit fluoreszierendem PKH-Membranfarbstoff markiert (MSZ rot und PCh grün), in 50/50-Ko-Kultur gebracht und mit oder ohne Zusatz von chondrogenem Differenzierungsmedium als 3D-HD-Massenkultur über einen Zeitraum von 3, 7 und 14 Tagen kultiviert. Nach Entnahme, Kryofixierung und Anfertigung der Schnitte mittels Kryomikrotom zeigte sich unter dem Fluoreszenzmikroskop, dass beide Zelltypen in allen Massenkulturen und zu jedem Zeitpunkt über der gesamten Kultur gleichmäßig verteilt waren. Es wurde keine Anhäufung einer bestimmten Zellpopulation in bestimmten Arealen der Kultur festgestellt (Abb. 17).

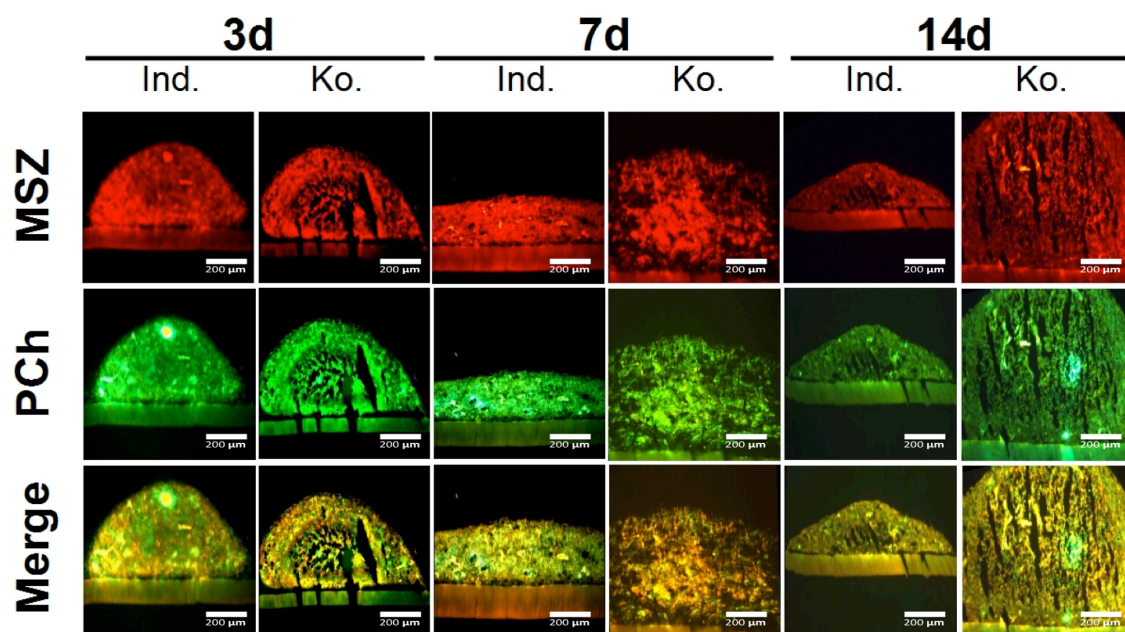


Abb. 17: 50/50 MSZ/PCh-Ko-Kultur mit PKH-Membranfärbung (MSZ rot, PCh grün) in 3D-HD-Massenkultur nach 3d, 7d und 14d Kultivierung. Ind.: Induktion mit chondrogenem Differenzierungs-medium, **Ko.:** Unbehandelt mit normalem Medium, **Obere Reihe:** Massenkultur unter rotem Fluoreszenzlicht; **Mittlere Reihe:** Massenkultur unter grünem Fluoreszenzlicht; **Untere Reihe:** Fusionsaufnahmen beider Zellpopulationen. Eine gleichmäßige Verteilung beider Zelltypen über die gesamte Kultur ist deutlich zu erkennen.

3.2.17.2 In Monolayer-Kultur mit PKH-Membranfärbung

Wie oben beschrieben wurden die Zellen zunächst getrennt in Suspension mit fluoreszierendem PKH-Membranfarbstoff angefärbt, MSZ mit rotem und PCh mit grünem Farbstoff. Im Anschluss wurden sie entweder als Reinkultur (100% MSZ und 100% PCh) oder als 50/50 Ko-Kultur auf Glasplättchen in der Petri-Schale mit der Dichte von ca. 5000 Zellen pro Plättchen mit normalem Zellkulturmedium für 4 Tage kultiviert. Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Täglich wurde ein Glasplättchen entnommen, mit Methanol für 10 min. fixiert, anschließend mit Aqua dest. gespült und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden digital gespeichert.

3.2.18 Endozytose-Exozytose-Assay

Jeweils 1,5 Mio. MSZ und PCh wurden in Zellkulturmedium getrennt voneinander suspendiert. MSZ wurden mit an 10 nm Goldpartikel konjugierten Sekundärantikörpern für 10 min. auf dem Schüttler inkubiert und anschließend dreimal à 5 min. mit PBS/BSA-Gemisch gespült, um Reste der Sekundärantikörper zu entfernen. Parallel wurden PCh mit an 5 nm Goldpartikel konjugierten Sekundärantikörpern für 10 min. auf dem Schüttler inkubiert und im Anschluss mit PBS/BSA 3x 5 min. gespült. Die Hälfte der Zellen wurde als Reinkultur für 24h und die andere Hälfte als MSZ/PCh-Ko-Kultur im Verhältnis 50:50 für 24h bzw. 48h in Suspension mit normalem Zellkulturmedium kultiviert. Nach Entnahme wurden die zu Zellpellets kondensierten Kulturen wie vorher beschrieben für die Analyse unter TEM eingebettet und elektronenmikroskopisch evaluiert. Die TEM-Aufnahmen wurden digital gespeichert.

4. ERGEBNISSE

4.1. Einfluss der Ko-Kultur aus MSZ und PCh in verschiedenen Mischungsverhältnissen in 3D-HD-Massenkultur auf die chondrogene Differenzierung von MSZ

Wie eingangs festgestellt, geht es in dieser Arbeit darum, zu zeigen, ob die Ko-Kultur aus MSZ und PCh im Massenkulturmodell einen positiven Einfluss auf die chondrogene Differenzierung von MSZ hat. Im Besonderen soll dabei die Rolle des Mischungsverhältnisses von MSZ und PCh untersucht werden. Um diese Fragen zu beantworten, wurden kanine mesenchymale Stammzellen (kMSZ) und primäre Chondrozyten (kPCh) wie oben beschrieben als Kontrollen (100% MSZ und 100% PCh) und als Ko-Kulturen mit verschiedenen Mischungsverhältnissen (90/10 MSZ/PCh, 70/30 MSZ/PCh und 50/50 MSZ/PCh) im Massenkulturmodell über einen Zeitraum von 21 Tagen mit chondrogem Differenzierungsmedium oder normalem Medium kultiviert.

4.1.1. Untersuchung der Morphologie der 3D-HD-Massenkulturen mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Unter dem TEM (Leica) zeigte sich in der induzierten Massenkultur aus 100% primären Chondrozyten ein strukturierter Zellverband aus rundlichen bis ovalen für Chondrozyten typischen Zellen in der Mitte des Schnittes und lang gestreckten fibroblastoiden Zellen im oberen Drittel des Schnittes (Abb. 18 A). Die Chondrozyten besaßen große runde Nuclei mit reichlich Euchromatin, zahlreichen stoffwechselaktiven Zellorganellen wie Mitochondrien, ausgeprägtem rauem endoplasmatischem Retikulum (rER) und Golgi-Apparat sowie intrazellulären Vesikeln. Teils waren sie, ähnlich dem Chondron *in vivo*, in Gruppen angeordnet. Der Interzellularraum war gefüllt von einer mächtigen, hoch organisierten EZM. Die lang gestreckten fibroblastoiden Zellen bildeten mehrere Zellschichten, waren in einer extrazellulären Matrix aus dickeren Fibrillenbündeln eingebettet und umgaben, ähnlich dem Perichondrium *in vivo*, die Chondrozyten (Abb. 18 A). Dieses Bild zeigte sich ebenfalls in der induzierten Massenkultur aus 100% primären MSZ sowie in den induzierten Ko-Kulturen aus MSZ und PCh unabhängig vom Mischungsverhältnis (Abb. 18 B-E). In allen Kulturen war ein geschlossener Zellverband mit vitalen stoffwechselaktiven Zellen mit für Chondrozyten typischer Morphologie erkennbar. Wie in der Aufnahme von 100% PCh ersichtl

(Abb. 18 A , B) waren die Zellen oval bis rundlich mit großem Zellkern, prominentem Nucleolus und einem hohen Anteil von Euchromatin. Zahlreiche Mitochondrien, raues ER, Golgi-Apparat und intrazelluläre Vesikel waren ebenfalls sichtbar (Abb. 18 B-E). Die EZM bestand aus dünnen, hoch strukturierten Fibrillenbündeln. Teilweise waren die chondroblastoiden Zellen wie in der induzierten Massenkultur aus 100% PCh von einem äußeren Zellverband aus fibroblastoiden Zellen umgeben (Abb. 18 B-E). Elektronenmikroskopisch ließen sich keine Unterschiede zwischen den Ko-Kulturen und den Massenkulturen aus 100% MSZ und PCh erkennen (Abb. 18 A -E).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der unbehandelten Massenkulturen aus 100% PCh und Ko-Kulturen zeigten unabhängig vom Mischungsverhältnis durchweg ein morphologisches Bild, das den induzierten Kulturen sehr ähnelte (Abb. 18 F, H-J). Auch hier fanden sich runde bis ovale Zellen mit für Chondrozyten typischen Charakteristika und einem voll entwickelten Proteinsyntheseapparat wie z.B. große Nuclei, Mitochondrien, rER und Golgi-Apparat. In manchen Zellen fanden sich intrazelluläre Vesikel. Auch hier waren an Chondrone erinnernde Zellnester sichtbar. Die EZM bestand aus dünnen, hoch organisierten Fibrillenbündeln und füllte den Interzellularraum aus (Abb. 18 F, H – J). Im Gegensatz dazu stellte sich in der Massenkultur aus unbehandelten 100% MSZ ein vollkommen anderes Bild dar. Die Zellen bildeten keinen geschlossenen Zellverband, indes waren sie stark aufgedunsen und zeigten Zeichen von Apoptose wie deformierte, fragmentierte Zellkerne (Karyorrhexis), Membranabschnürungen (membrane bedding) und Zelltrümmer (apoptotic bodies) (Abb. 18 G).

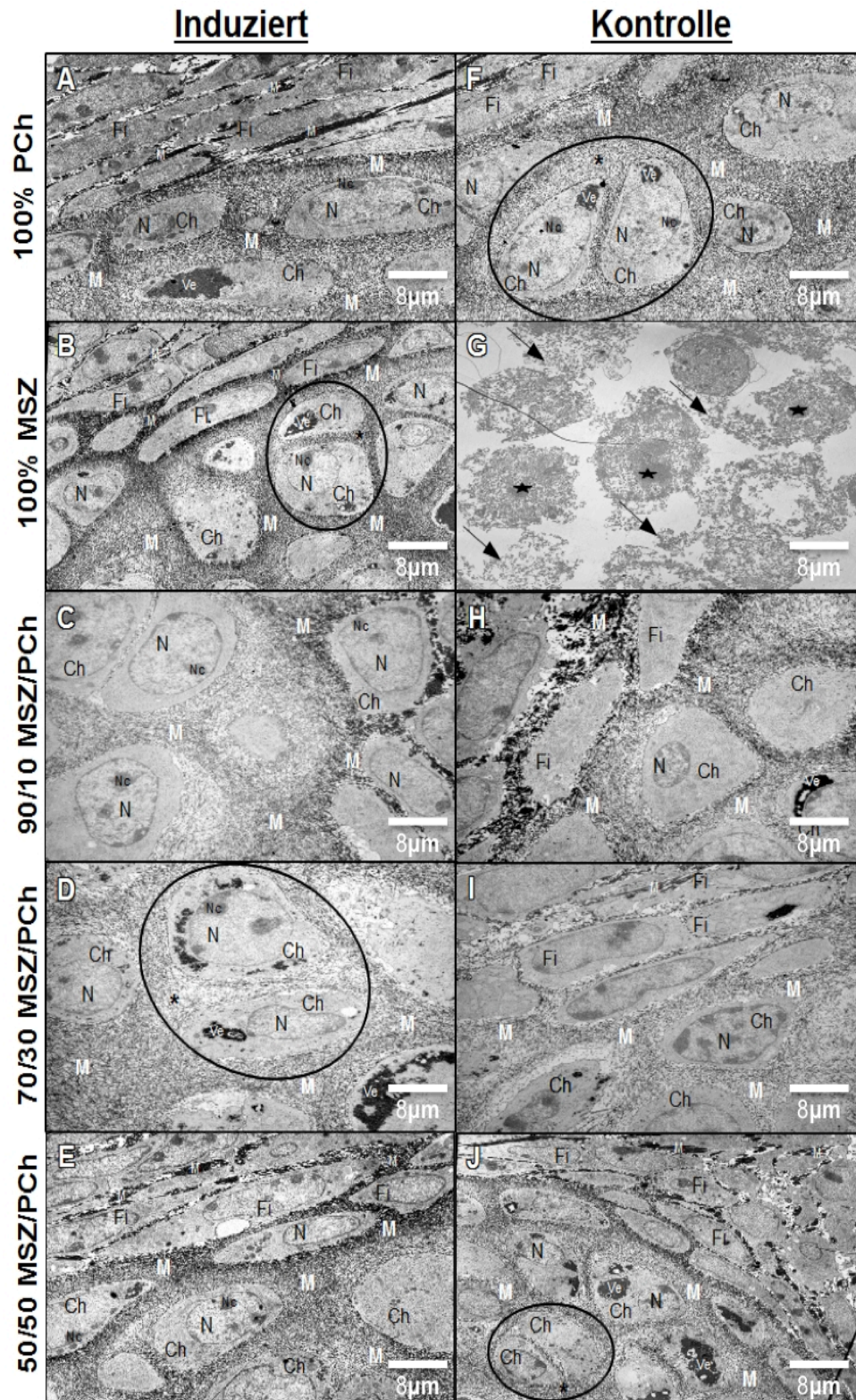


Abb. 18: Elektronenmikroskopische Aufnahmen chondrogen induzierter (**A – E**) und un behandelter Massenkulturen (**F – J**) aus 100% PCh, 100% MSZ und MSZ/PCh-Ko-Kulturen in verschiedenen Mischungsverhältnissen nach 21 Tagen. **Ch:** Chondroblastoide Zellen; **N:** Nukleus; **Nc:** Nukleolus **Ve:** Intrazelluläre Vesikel; **M:** Extrazelluläre Matrix (EZM); **Fi:** Fibroblastoide Zellen z. T. paarweise gruppiert (*); **G:** Unbehandelte 100% MSZ; **Sterne:** Pyknose und Karyorrhexis; **Pfeile:** Zelltrümmer im Interzellularraum.

4.1.2. Untersuchung der extrazellulären Matrix der MSZ/PCh-Ko-Kulturen auf knorpelspezifische Proteine mittels Immunelektronenmikroskopie

Um die Zusammensetzung der elektronenmikroskopisch nachweisbaren, neu synthetisierten extrazellulären Matrix (EZM) der Ko-Kulturen auf knorpelspezifische Proteine zu überprüfen, wurden die Ko-Kulturen mit an Goldpartikel gekoppelten Antikörpern gegen Kollagen Typ II und knorpelspezifische Proteoglykane (CSPG) inkubiert und anschließend einer immunelektronenmikroskopischen Analyse zugeführt. Die Massenkulturen aus 100% PCh dienten als positive Vergleichskontrolle.

In allen induzierten und unbehandelten Ko-Kulturen unabhängig vom Mischungsverhältnis fand sich eine deutliche Markierung von Kollagen Typ II in der extrazellulären Matrix (EZM) vergleichbar den Positivkulturen aus 100% PCh (Abb. 19). Die mit Goldpartikeln besetzten Antikörper gegen Kollagen Typ II waren eng an die Fibrillenbündel angelagert und fanden sich gleichmäßig über der gesamten EZM verteilt (Abb. 19). Darüber hinaus war die knorpeltypische, maschendrahtartige Architektur des extrazellulären Fibrillennetzwerks deutlich sichtbar (Abb. 19). Die Immungoldmarkierung für knorpelspezifische Proteoglykane (CSPG) war ebenfalls positiv für alle Ko-Kulturen unabhängig von Induktion und Mischungsverhältnis (Abb. 20). Goldmarkiertes CSPG fand sich in Clustern mit hoher Konzentration in bestimmten Arealen zwischen den Kollagenfibrillen wie in der positiven Kontrollkultur aus 100% PCh (Abb. 20).

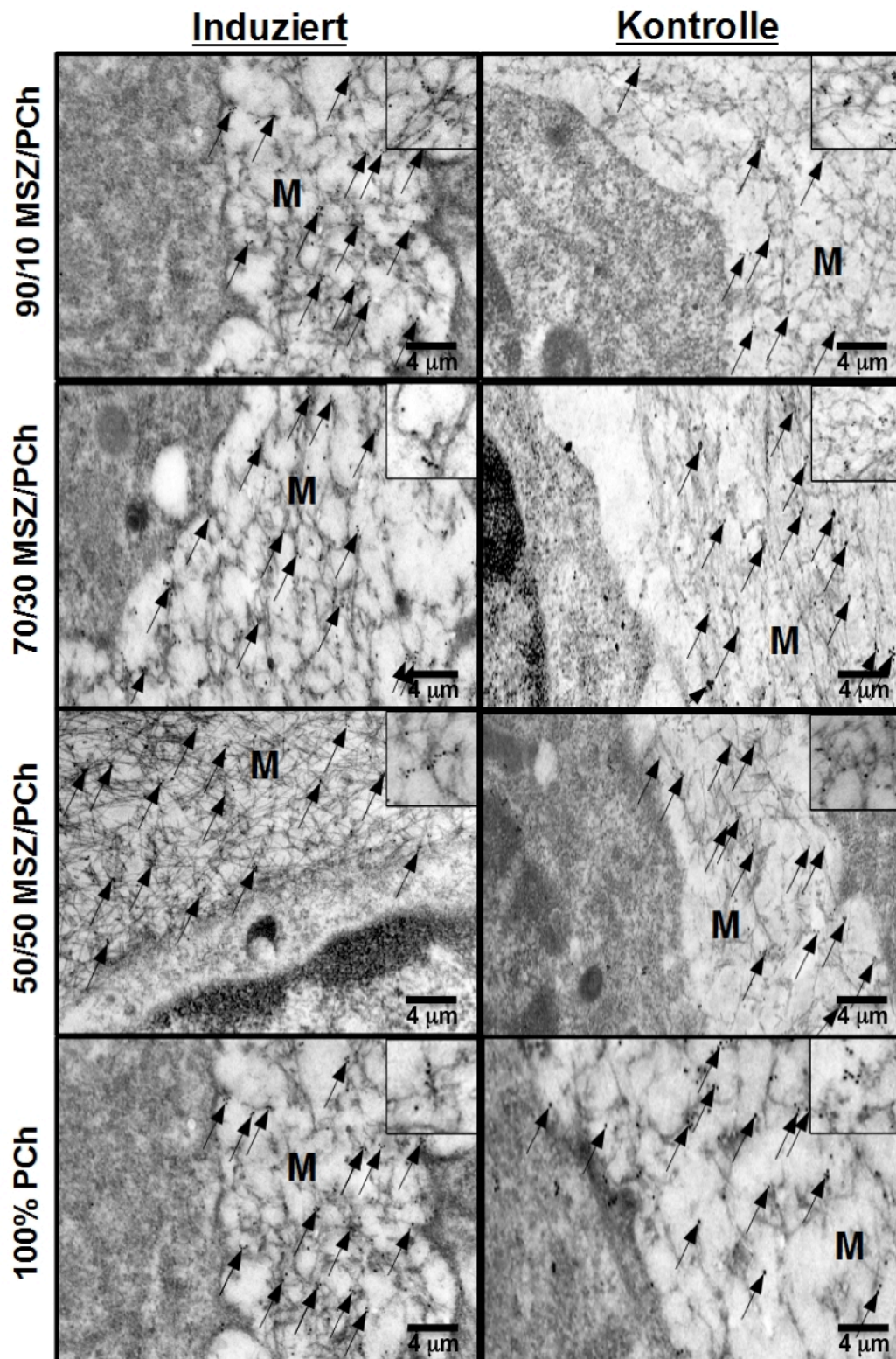


Abb. 19: Immunelektronenmikroskopische Markierung von Kollagen Typ II in kaninen MSZ/PCh Ko-Kulturen mit verschiedenen Mischungsverhältnissen und 100% PCh mit oder ohne chondrogene/r Induktion nach 21 Tagen in 3D-HD-Massenkultur. Goldmarkierte Fibrillenbündel aus Kollagen Typ II (Inlets) lassen sich in allen Ko-Kulturen wie in der Positivkontrolle aus 100% PCh in der EZM (M) nachweisen (Pfeile). Der Interzellularraum ist gefüllt mit einer hoch organisierten, knorpeltypischen maschendrahtartigen EZM (M).

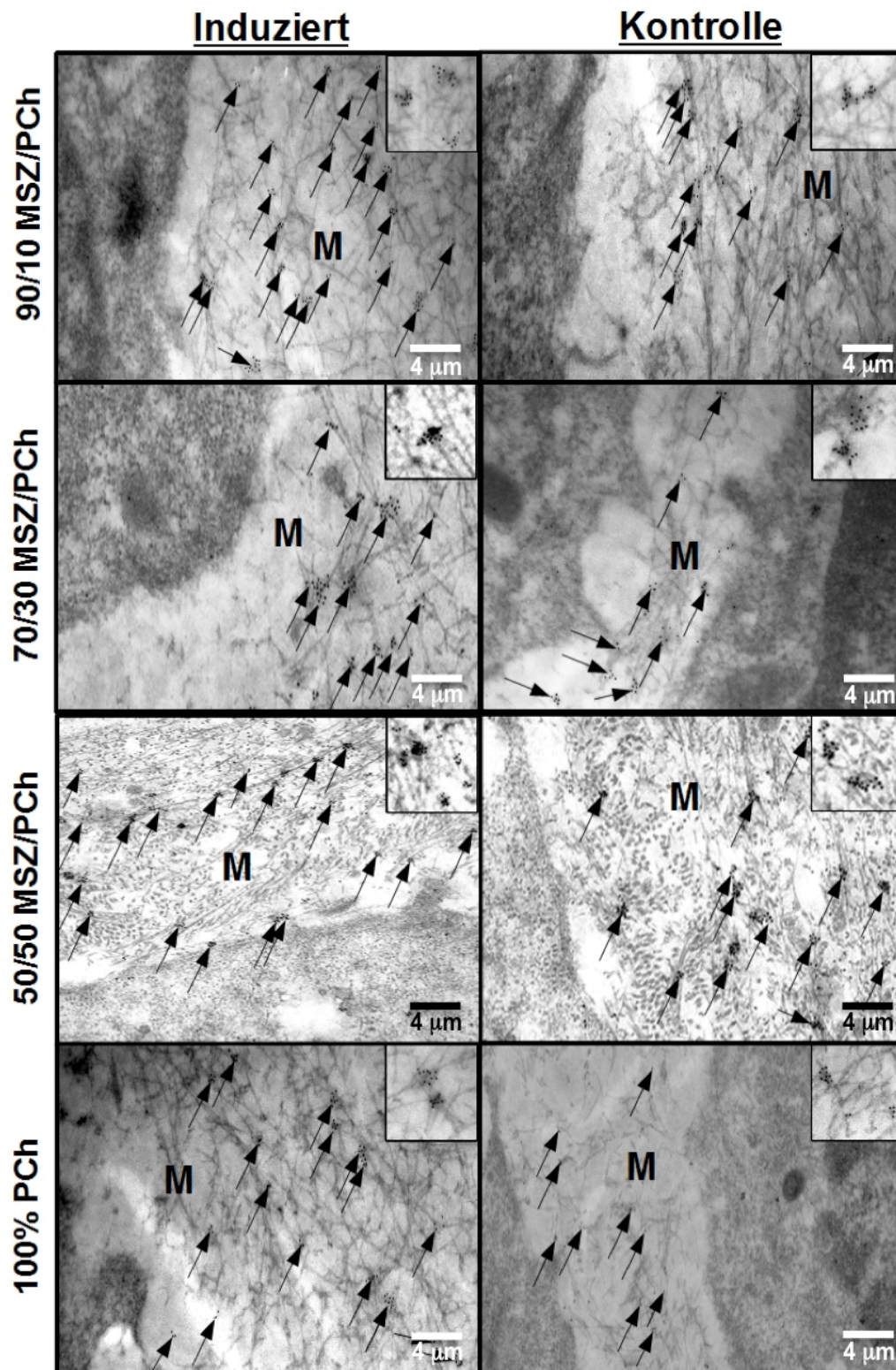


Abb. 20: Immunelektronenmikroskopische Markierung von CSPG in kaninen MSZ/PCh Ko-Kulturen mit verschiedenen Mischungsverhältnissen und 100% PCh mit oder ohne chondrogene/r Induktion nach 21 Tagen in HD-Massenkultur. Goldmarkiertes CSPG in Clustern (Inlets) zwischen den Kollagenbündeln in der EZM (M) findet sich in allen Ko-Kulturen unabhängig von Mischungsverhältnis und Induktion sowie in der Positivkontrolle aus 100% PCh (Pfeile).

4.1.3. Untersuchung der Proteinexpression der MSZ/PCh-Kulturen

Um die elektronenmikroskopisch und immunomorphologisch beobachteten Ergebnisse genauer zu quantifizieren und darüber hinaus Signalkaskaden der Chondrogenese zu verstehen, wurde die Proteinexpression der Ko-Kulturen und der Reinkulturen aus MSZ und PCh mittels SDS-PAGE Westernblot untersucht.

Das extrazelluläre Matrixprotein Kollagen Typ II wurde in allen Kulturen mit Ausnahme der aus unbehandelten 100%igen MSZ nachgewiesen (Abb. 21). Dabei zeigte sich in den unbehandelten Ko-Kulturen eine graduelle Konzentrationszunahme von Kollagen Typ II mit steigendem Anteil von Chondrozyten in der Ko-Kultur (Abb. 21 B-D). Die höchste Konzentration von Kollagen Typ II fand sich in den Ko-Kulturen aus 50/50 MSZ/PCh, die mit der der Reinkulturen aus 100% PCh vergleichbar war oder diese teilweise sogar übertraf (Abb. 21 D-E). In den chondrogen induzierten Kulturen indes zeigte sich ein anderes Bild. Kollagen Typ II war durchweg nachzuweisen sowohl in den Kulturen aus 100% MSZ als auch in allen Ko-Kulturen, wobei die Konzentration in den 100% MSZ-Kulturen und den 90/10 Ko-Kulturen auf vergleichbarem Niveau lag und die in den 70/30 und 50/50 Ko-Kulturen dem erhöhten Expressionslevel der 100% PCh-Kulturen nahe kam (Abb. 21 F-J). Verglichen mit den unbehandelten Kulturen lag die Proteinkonzentration der chondrogen induzierten Kulturen teilweise deutlich höher. Dies zeigte sich besonders deutlich in den induzierten 90/10- und 70/30- Ko-Kulturen verglichen mit den entsprechend unbehandelten Kulturen (Abb. 21 B - C, G - H). Das Niveau der Proteinexpression in den 50/50-Ko-Kulturen und 100% PCh-Kulturen war unabhängig von Behandlung mit chondrogenem Differenzierungsmedium ähnlich hoch (Abb. 21 D - E, I - J). Das House-keeping Protein β -Aktin blieb durchgängig unbeeinflusst und war stets nachweisbar (Abb. 21).

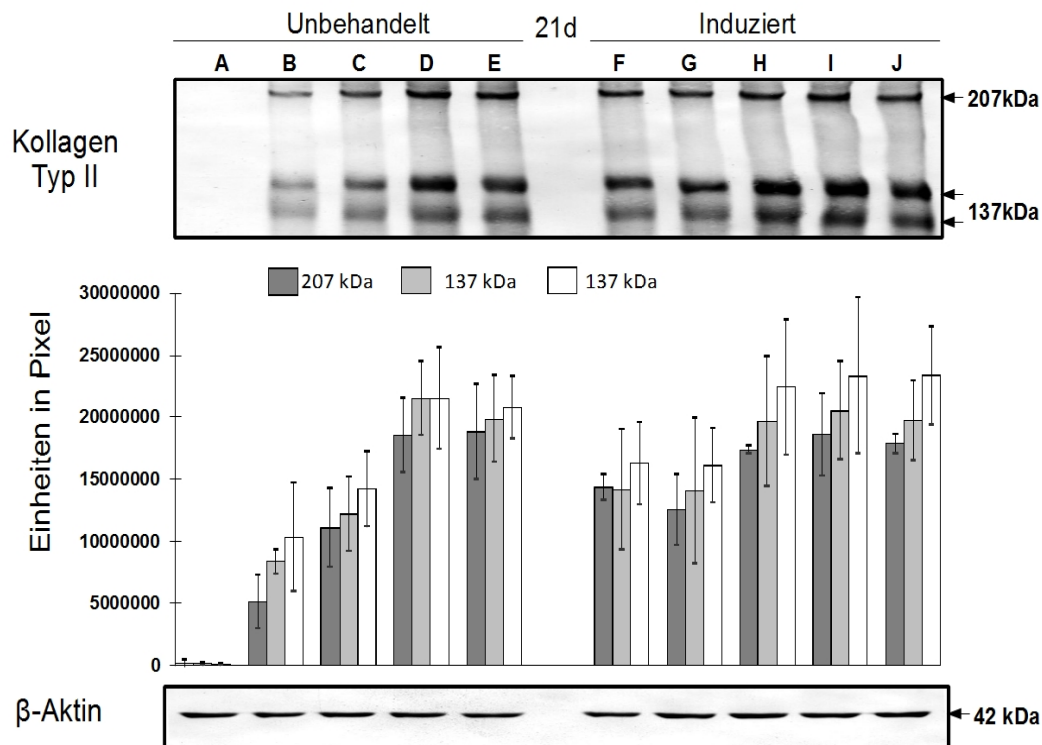


Abb. 21: Westernblot-Analyse von Kollagen Typ II in Kulturen aus 100% MSZ und 100% PCh sowie Ko-Kulturen in verschiedenen Mischungsverhältnissen nach 21 Tagen Kultivierung in 3D-HD-Massenkultur mit oder ohne chondrogene/r Induktion. (A/F) 100% MSZ; (B/G) 90/10 MSZ/PCh; (C/H) 70/30 MSZ/PCh; (D/I) 50/50 MSZ/PCh; (E/J) 100% PCh; (F-J) kultiviert mit chondrogenem Differenzierungsmedium.

Das knorpelspezifische extrazelluläre Matrixprotein CSPG ließ sich in allen Kulturen bis auf die unbehandelte Kultur aus 100% MSZ nachweisen (Abb. 22). Auch hier konnte in den unbehandelten Ko-Kulturen eine sukzessive Zunahme der CSPG-Konzentration mit steigendem Gehalt von PCh in der Ko-Kultur beobachtet werden, wobei die Konzentration in den 50/50 Ko-Kulturen die der 100% PCh-Kulturen am nächsten kam (Abb. 22 B-E). In den chondrogen induzierten Kulturen konnte hingegen auch in den 100% MSZ-Kulturen CSPG-Synthese nachgewiesen werden, deren Konzentration die der induzierten 90/10 Ko-Kulturen sogar leicht übertraf (Abb. 22 F-G). Eine vom Mischungsverhältnis abhängige Zunahme der Proteinkonzentration in den induzierten Ko-Kulturen war analog zu den unbehandelten Kulturen ebenfalls feststellbar, wobei sie in den 70/30- und 50/50 Ko-Kulturen mit der in den 100% PCh-Kulturen auf vergleichbarer Höhe lag (Abb. 22 G -J). Auffällig ist zudem, dass die Proteinkonzentration in den induzierten Kulturen aus 100% MSZ (Abb. 22 F) deutlich

über dem Niveau der unbehandelten 90/10- und 70/30-Ko-Kulturen lag (Abb. 22 F, B – C). Außerdem konnte festgestellt werden, dass das Expressionsniveau von CSPG in den induzierten 90/10- und 70/30- Ko-Kulturen deutlich höher war als das ihrer unbehandelten Pendanten (Abb. 22 B – C, G – H). Dies galt jedoch nicht für die 50/50-Ko-Kulturen und 100% PCh-Kulturen. Es zeigte sich hier, dass die Proteinexpression in den unbehandelten 50/50-Ko-Kulturen und 100% PCh-Kulturen die der entsprechend induzierten Kulturen teilweise überstieg (Abb. 22 D-E, I-J). Das House-Keeping Protein β -Aktin war in allen Kulturen gleichmäßig nachweisbar (Abb. 22).

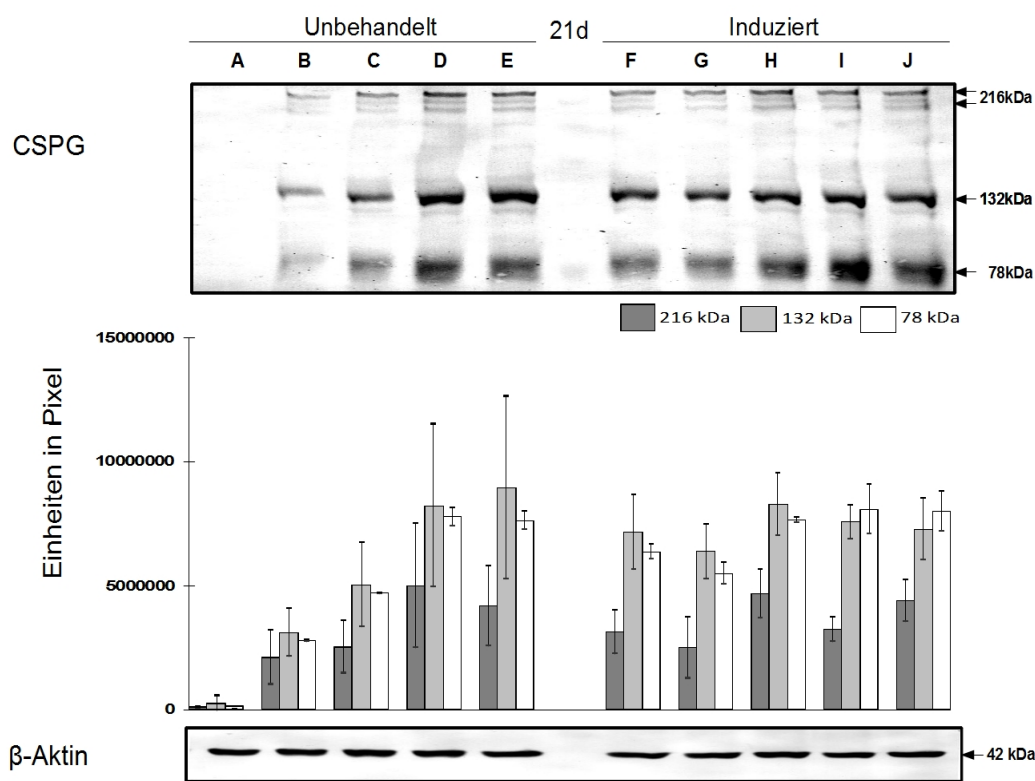


Abb. 22: Westernblot-Analyse von CSPG in Kulturen aus 100% MSZ, 100% PCh und Ko-Kulturen in verschiedenen Mischungsverhältnissen nach 21 Tagen Kultivierung in 3D-HD-Massenkultur mit oder ohne chondrogene/r Induktion. (A/F) 100% MSZ; (B/G) 90/10 MSZ/PCh; (C/H) 70/30 MSZ/PCh; (D/I) 50/50 MSZ/PCh; (E/J) 100% PCh; (F-J) kultiviert mit chondrogenem Differenzierungsmedium.

Die Westernblotanalyse vom Membranadhäsions- und Signaltransduktionsprotein β_1 -Integrin zeigte eine Expressionsweise, die mit den vorher erwähnten Beobachtungen konsistent war. In unbehandelten Kulturen aus 100% MSZ waren nur kaum nachweisbare Spuren von β_1 -Integrin zu finden (Abb 23 A). Ein dem zunehmenden Anteil von Chondrozyten in der Ko-Kultur entsprechender Anstieg der β_1 -Integrin-Expression ließ sich auch hier in den unbehandelten Ko-Kulturen feststellen (Abb. 23 B-D). Dabei kam die Proteinkonzentration in den unbehandelten 50/50 MSZ/PCh-Ko-Kulturen der in den Kontrollkulturen aus 100% PCh am nächsten und lag gar auf ähnlicher Höhe wie in den induzierten 100%igen PCh-Kulturen (Abb.23 D-E, J). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Kultivierung mit chondrogenem Differenzierungsmedium, dass MSZ ebenfalls β_1 -Integrin exprimierten, dessen Konzentration auf vergleichbarem Niveau von induzierten 90/10-Ko-Kulturen, induzierten 100% PCh-Kulturen und unbehandelten 50/50-Ko-Kulturen lag (Abb. 23 F – G, D, J). Insgesamt hatten die induzierten Kulturen mit Ausnahme der 100% PCh-Kulturen höhere Proteinexpressionswerte als die entsprechend unbehandelten Kulturen (Abb. 23). In den chondrogen induzierten Ko-Kulturen stieg die Proteinkonzentration ebenfalls wie bereits beobachtet mit entsprechend zunehmendem Chondrozytengehalt an mit dem höchsten Wert in den 50/50-Ko-Kulturen (Abb. 23 G-I). Interessanterweise lag sie gar über dem Niveau der Vergleichskulturen aus induzierten 100% PCh und war mit der Proteinkonzentration der unbehandelten 100% PCh-Kulturen vergleichbar (Abb. 23 I – J, E). Dies traf ebenso auf die induzierten 70/30-Ko-Kulturen zu, wobei hier eine größere Deviation in den Messungen zwischen den Proben bestand (Abb. 23 H, J, E). Die Proteinkonzentration in den induzierten 90/10-Ko-Kulturen war auf vergleichbarem Expressionsniveau der unbehandelten 50/50-Ko-Kulturen (Abb. 23 G, D). Die Expression des Kontrollproteins β -Aktin blieb unbeeinflusst (Abb. 23).

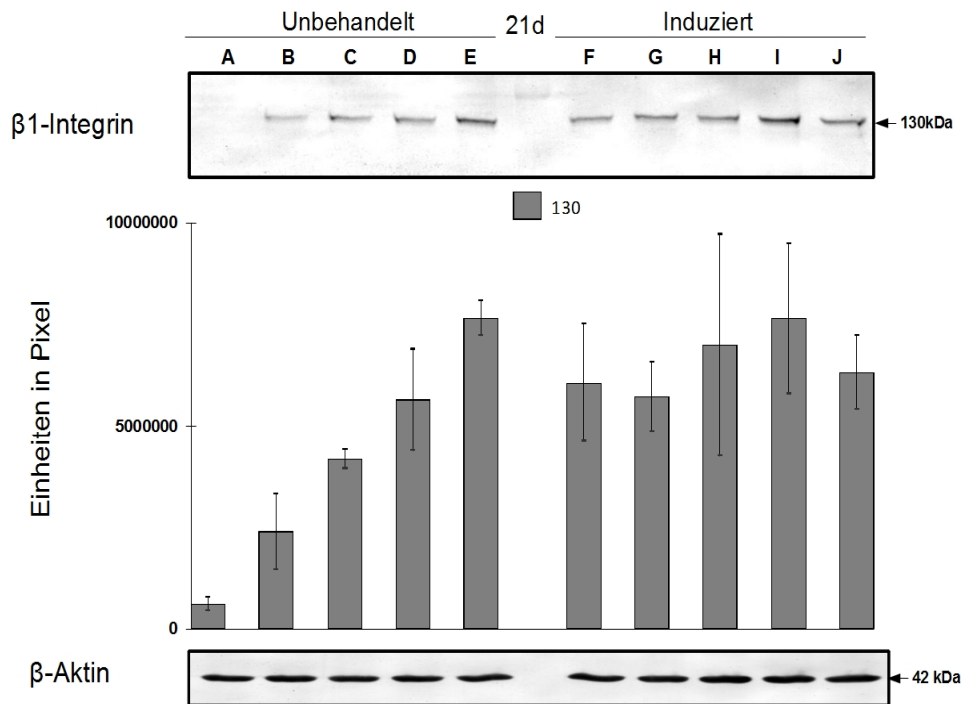


Abb. 23: Westernblot-Analyse von β_1 -Integrin in Kulturen aus 100% MSZ, 100%PCh und Ko-Kulturen in verschiedenen Mischungsverhältnissen nach 21 Tagen Kultivierung in 3D-HD-Massenkultur mit oder ohne chondrogene/r Induktion. (A/F) 100% MSZ; (B/G) 90/10 MSZ/PCh; (C/H) 70/30 MSZ/PCh; (D/I) 50/50 MSZ/PCh; (E/J) 100% PCh; (F-J) inkubiert mit chondrogenem Differenzierungsmedium.

Für die intrazellulären Signaltransduktionsproteine Shc und Erk1/2 sowie den chondrogenen Transkriptionsfaktor Sox-9 wurde jedoch ein leicht abweichendes Expressionsmuster festgestellt. Zunächst wurde die Expression des Adaptorproteins Shc, das am für Chondrogenese wichtigen MAPKinase-Pathway beteiligt ist, analysiert. Wie bisher gezeigt wurde Shc in allen Kulturen mit Ausnahme der unbehandelten MSZ-Kulturen nachgewiesen (Abb. 24). Die Expression von Shc in den unbehandelten Kulturen entsprach den bisherigen Beobachtungen. MSZ der unbehandelten Kontrollkulturen exprimierten nur verschwindend geringe Mengen von Shc, während die übrigen unbehandelten Ko-Kulturen eine graduell steigende Proteinsynthese zeigten proportional zu zunehmendem Chondrozytenanteil (Abb. 24 A-D). Die Proteinkonzentration in den 50/50 Ko-Kulturen überstieg die der anderen Ko-Kulturen und kam der in den unbehandelten Kulturen aus 100% PCh am nächsten (Abb. 24 D, E). In den chondrogen induzierten Kulturen indes konnte in den 100% MSZ-Kulturen eine starke Shc-Expression festgestellt werden, deren Konzentration auf dem gleichen

Niveau lag wie die Vergleichskulturen aus unbehandelten oder induzierten 100% PCh (Abb. 24 F, E, J). Sie überstieg somit alle anderen Ko-Kulturen mit oder ohne Induktion deutlich (Abb. 24 F, B- D, G -I). Die übrigen induzierten Ko-Kulturen zeigten wie bisher eine dem Mischungsverhältnis entsprechende Steigerung der Proteinexpression mit der niedrigsten Konzentration in den 90/10 und der höchsten in den 50/50 Ko-Kulturen, wobei der Unterschied zwischen induzierten 70/30- und 50/50-Ko-Kulturen nur minimal war (Abb. 24 G-I). Sie reichte jedoch nicht an die der induzierten 100% MSZ-Kulturen heran und war ebenfalls bedeutend niedriger als die der Kontrollkulturen aus 100% PCh (Abb. 24 H - I, F, E, J). Verglichen mit den unbehandelten Ko-Kulturen hatten die induzierten Ko-Kulturen leicht höhere Expressionswerte (Abb. 24 B-D, G-I). β -Aktin wurde von allen Kulturen gleichermaßen exprimiert (Abb. 24).

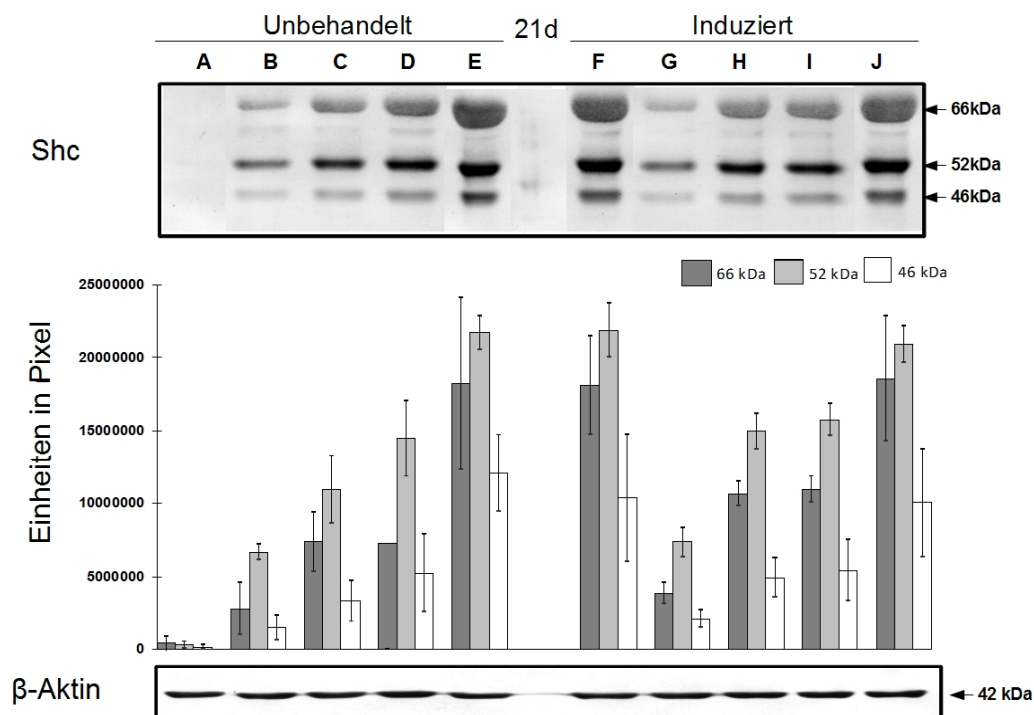


Abb. 24: Westernblot-Analyse von Shc in Kulturen aus 100% MSZ, 100% PCh und Ko-Kulturen in verschiedenen Mischungsverhältnissen nach 21 Tagen Kultivierung in 3D-HD-Massenkultur mit oder ohne chondrogene/r Induktion. (A/F) 100% MSZ; (B/G) 90/10 MSZ/PCh; (C/H) 70/30 MSZ/PCh; (D/I) 50/50 MSZ/PCh; (E/J) 100% PCh; (F-J) inkubiert mit chondrogenem Differenzierungsmedium.

Zusätzlich zu Shc wurde die Expression des im MAPKinase-Pathway weiter stromabwärts gelegenen Proteins Erk1/2 untersucht. In den nicht induzierten MSZ-Kulturen konnte wie bisher festgestellt keine Aktivierung von Erk1/2 festgestellt werden (Abb. 25 A). Entgegen den bisherigen Beobachtungen fanden sich sowohl in den unbehandelten als auch in den induzierten 90/10 Ko-Kulturen lediglich kaum nachweisbare Mengen von Erk1/2 (Abb. 25 B, G). In den übrigen unbehandelten Ko-Kulturen, nämlich den 70/30- und 50/50 Ko-Kulturen, sowie in den nicht induzierten Kontrollkulturen aus 100% PCh war eine deutliche Erk1/2-Expression feststellbar (Abb. 25 C-E). Dabei lag die Proteinkonzentration in den 50/50 Ko-Kulturen dem höheren Chondrozytenanteil entsprechend leicht höher als die in den 70/30 Ko-Kulturen und entsprach dem gleichen Niveau der 100% PCh-Kulturen (Abb. 25 C-E). Auffällig war dabei zudem, dass durchgängig die 44kDa Isoform des Proteins deutlich schwächer exprimiert wurde als die 42kDa Isoform (Abb. 25).

In den behandelten Kulturen war das Expressionsmuster vergleichbar mit dem von Shc. In den chondrogen induzierten MSZ konnte, im Gegensatz zu unbehandelten MSZ, eine deutliche Expression von Erk1/2 beobachtet werden (Abb. 25 F, A). Die Proteinkonzentration war merklich höher als alle Ko-Kulturen und überstieg gar vor allem in Bezug auf die 42 kDa Isoform das Niveau der 100% PCh mit oder ohne Induktion (Abb. 25 F, A –E, G –J). In den übrigen induzierten Ko-Kulturen war wie gewohnt eine mit zunehmendem Chondrozytenanteil verstärkte Erk1/2-Aktivierung festzustellen mit dem niedrigsten Wert in den 90/10- und dem höchsten in den 50/50-Ko-Kulturen (Abb. 25 G-I). Auch hier war interessanterweise zu beobachten, dass die 42 kDa Isoform von Erk1/2 in den induzierten 50/50- Ko-Kulturen höher exprimiert wurde als in den Kontrollkulturen aus 100% PCh (Abb. 25 I, E, J). Zwischen den unbehandelten und induzierten Ko-Kulturen bestand in Bezug auf die Proteinexpression jedoch erhebliche Diskrepanz. Die 90/10-Ko-Kulturen hatten wie bereits erwähnt unabhängig von Induktion kaum nachweisbare Erk1/2-Expression (Abb. 25 B, G). In den unbehandelten 70/30-Ko-Kulturen wurde Erk1/2 jedoch bezüglich beider Isoformen teilweise stärker aktiviert als die induzierten 70/30-Ko-Kulturen (Abb. 25 C, H). Umgekehrt wurde in den induzierten 50/50-Ko-Kulturen die 42 kDa Isoform deutlich stärker exprimiert als in den unbehandelten 50/50-Ko-Kulturen, wohingegen die Proteinkonzentration der 44 kDa Isoform in den unbehandelten höher war als in den chondrogen induzierten 50/50-

Ko-Kulturen (Abb. 25 D, I). β -Aktin war in allen Kulturen nachzuweisen und wurde nicht beeinflusst (Abb. 25).

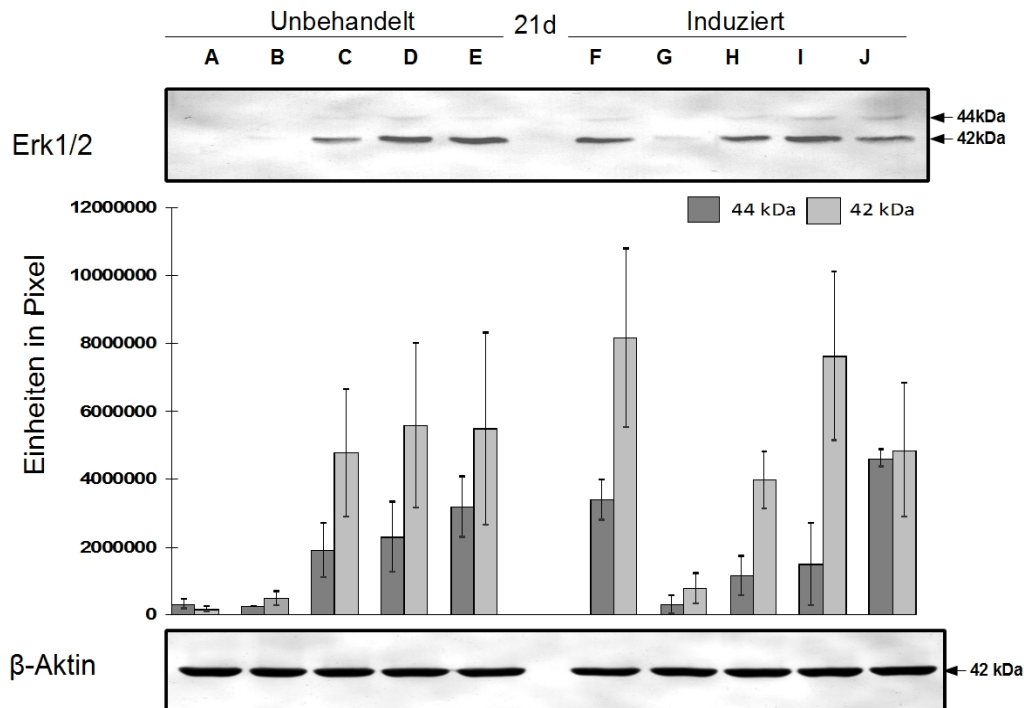


Abb. 25: Westernblot-Analyse von Erk1/2 in Kulturen aus 100% MSZ, 100% PCh und Ko-Kulturen in verschiedenen Mischungsverhältnissen nach 21 Tagen Kultivierung in 3D-HD-Massenkultur mit oder ohne chondrogene/r Induktion. (A/F) 100% MSZ; (B/G) 90/10 MSZ/PCh; (C/H) 70/30 MSZ/PCh; (D/I) 50/50 MSZ/PCh; (E/J) 100% PCh; (F-J) inkubiert mit chondrogenem Differenzierungsmedium.

Schließlich wurde die Expression des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox-9 mittels Westernblot eingehend untersucht. Wie in den bisherigen Beobachtungen wurde Sox-9 in allen Kulturen bis auf die unbehandelten MSZ aktiviert (Abb. 26). In den nicht induzierten Ko-Kulturen konnte eine Zunahme der Proteinkonzentration proportional zum steigenden Gehalt von PCh in der Ko-Kultur beobachtet werden, wobei ein sprunghafter Anstieg der Proteinexpression von den 90/10- zu 70/30- Ko-Kulturen zu verzeichnen war (Abb. 26 B-D). Die Proteinkonzentration in den 70/30 und 50/50 Ko-Kulturen war ähnlich hoch und überstiegen die der unbehandelten Kontrollkulturen aus 100% PCh sogar (Abb. 26 C-E). Zudem zeigte sich, dass das Expressionsniveau von Sox-9 der unbehandelten 50/50-Ko-Kulturen dem der induzierten Kontrollkulturen aus 100% PCh entsprach (Abb. 26 D, J).

Im Gegensatz dazu, aber in Kongruenz mit allen bisherigen Beobachtungen, war auch in den chondrogen induzierten MSZ eine deutliche Aktivierung von Sox-9 feststellbar, dessen Konzentration die der induzierten 90/10 Ko-Kulturen auf markante Weise überstieg und sogar höher lag als in den Kontrollkulturen aus unbehandelten 100% PCh (Abb. 26 F, G, E). Sie war auch mit der Höhe der Proteinexpression in den induzierten Kulturen aus 100% PCh vergleichbar (Abb. 26 F, J). Die übrigen induzierten Ko-Kulturen exprimierten Sox-9 ihrem Chondrozytenanteil entsprechend mit der niedrigsten Konzentration in den 90/10- und der höchsten in den 50/50-Ko-Kulturen, die dem Expressionsniveau der induzierten 100% PCh-Kulturen nahe kam (Abb. 26 G-J). Auch hier waren die schlagartige Steigerung der Proteinkonzentration von den 90/10- zu 70/30-Ko-Kulturen und eine verstärkte Sox-9-Aktivierung proportional zum vermehrten PCh-Anteil in der Ko-Kultur die augenfälligsten Merkmale (Abb. 26 G-I). Zwischen den Ko-Kulturen der unbehandelten und induzierten Reihe lag die Proteinkonzentration in den unbehandelten Ko-Kulturen durchweg leicht höher als in den chondrogen Induzierten (Abb. 26 B -D, G -I). Das House-keeping Protein β -Aktin ließ sich in allen Kulturen unverändert nachweisen (Abb. 26).

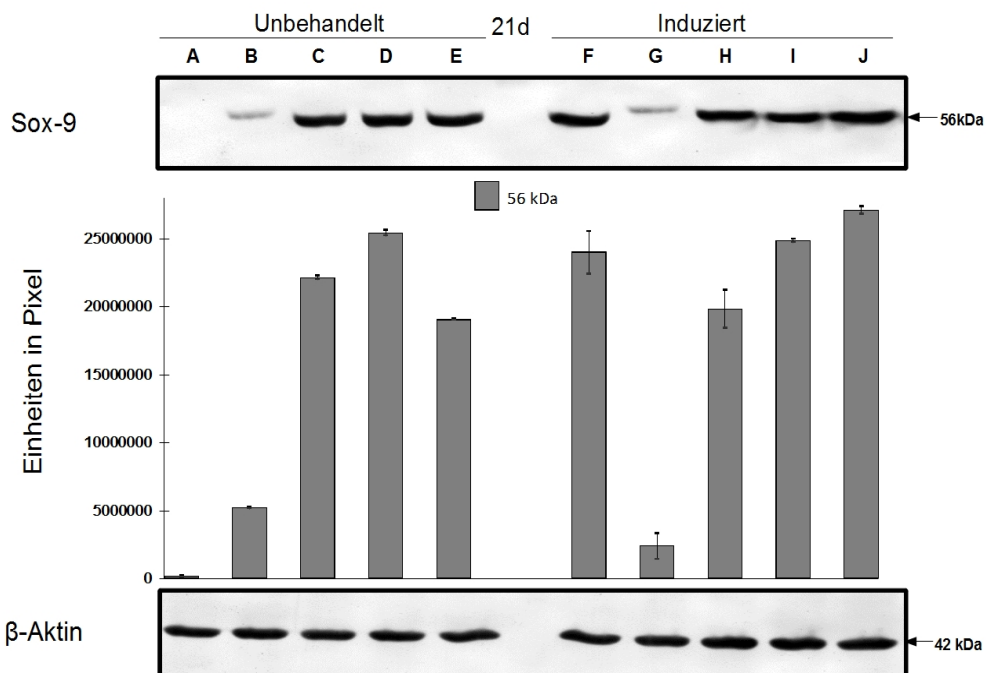


Abb. 26: Westernblot-Analyse von Sox-9 in Kulturen aus 100% MSZ, 100%PCh und Ko-Kulturen in verschiedenen Mischungsverhältnissen nach 21 Tagen Kultivierung in 3D-HD-Massenkultur mit oder ohne chondrogene/r Induktion. (A/F) 100% MSZ; (B/G) 90/10 MSZ/PCh; (C/H) 70/30 MSZ/PCh; (D/I) 50/50 MSZ/PCh; (E/J) 100% PCh; (F-J) inkubiert mit chondrogenem Differenzierungsmedium.

Zuletzt wurde das extrazelluläre Matrixprotein Kollagen Typ X als Marker für chondrale Hypertrophie und Kalzifikation untersucht. Es wurde erwartungsgemäß in den unbehandelten MSZ-Kulturen kein Kollagen Typ X festgestellt (Abb. 27 A). In allen anderen Kulturen konnte nach 21-tägiger Kultivierung in 3D-HD-Massenkultur Kollagen Typ X in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen werden, auch in den reinen Chondrozytenkulturen unabhängig von Induktion (Abb. 27 B-J). Die Proteinkonzentration in den unbehandelten Kulturen nahm wie in den bisherigen Beobachtungen mit steigendem Chondrozytengehalt in der Ko-Kultur stetig zu mit der niedrigsten Konzentration in den 90/10- und der höchsten in den 50/50-MSZ/PCh-Ko-Kulturen (Abb. 27 B-D). Dabei lag die Proteinkonzentration in den unbehandelten 50/50-Ko-Kulturen auf vergleichbar hohem Niveau wie die der unbehandelten 100% PCh-Kulturen (Abb. 27 D-E). In den chondrogen induzierten Kulturen entsprach mit Ausnahme der reinen MSZ-Kulturen die Proteinexpression weitgehend dem gleichen Muster der unbehandelten Ko-Kulturen. Abhängig vom Mischungsverhältnis stieg die nachweisbare Menge von Kollagen Typ X von der geringsten Konzentration in den 90/10-Ko-Kulturen kontinuierlich an bis zur höchsten in den 50/50-Ko-Kulturen (Abb. 27 G-I). Auch war das Expressionsniveau zwischen unbehandelten und induzierten Ko-Kulturen ähnlich hoch (Abb. 27 B- D, G -I). In den induzierten Massenkulturen aus 100% MSZ konnte hingegen eine hohe Konzentration an Kollagen Typ X festgestellt werden (Abb. 27 F). Die Proteinkonzentration entsprach der der unbehandelten und induzierten PCh-Kulturen und überstieg die sämtlicher Ko-Kulturen deutlich (Abb. 27 F, A – E, G - J). Das House-keeping Protein β -Aktin blieb in allen Kulturen unbeeinflusst nachweisbar (Abb. 27).

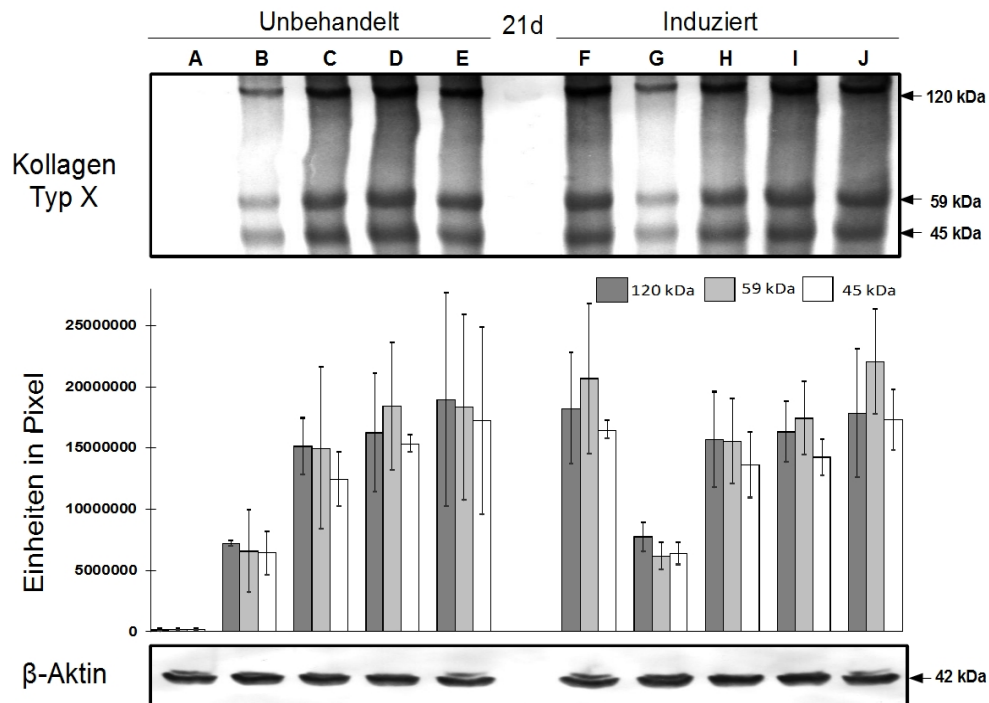


Abb. 27: Westernblot-Analyse von Kollagen Typ X in Kulturen aus 100% MSZ, 100% PCh und Ko-Kulturen in verschiedenen Mischungsverhältnissen nach 21 Tagen Kultivierung in 3D-HD-Massenkultur mit oder ohne chondrogene/r Induktion. (A/F) 100% MSZ; (B/G) 90/10 MSZ/PCh; (C/H) 70/30 MSZ/PCh; (D/I) 50/50 MSZ/PCh; (E/J) 100% PCh; (F-J) inkubiert mit chondrogenem Differenzierungsmedium.

4.2. Zell-Zell-Interaktion zwischen MSZ und PCh in Monolayer-Kultur

Basierend auf den bisherigen Beobachtungen, dass trotz fehlender Inkubation mit chondrogenen Induktionsfaktoren in den Ko-Kulturen aus MSZ und PCh in den verschiedenen Mischungsverhältnissen knorpelspezifische Merkmale auf ultrastrukturell-morphologischer und immunhistochemischer Ebene nachweisbar waren, wurde nachfolgend die Interaktion beider Zellpopulationen auf zellulärer Ebene näher studiert, um so eine mögliche Erklärung für den vermuteten positiv-induktiven Effekt des Ko-Kultur-Massenkulturmodells auf die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen zu liefern. Dazu wurden wie bereits erwähnt die Zellen mit fluoreszierendem PKH-Membranfarbstoff markiert, in Monolayer-Kultur ko-kultiviert und anschließend der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zugeführt. Darüber hinaus wurden sie in einem weiteren Experiment mit an Goldpartikel gekoppelten Antikörpern verschiedener Größen inkubiert und anschließend in Ko-Kultur gebracht, um so mögliche Stoffaustauschvorgänge mittels Elektronenmikroskopie zu analysieren.

4.2.1. Untersuchung der MSZ/PCh-Ko-Kulturen in PKH-Monolayer-Kultur

Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica) ließ sich zunächst in den Übersichtsaufnahmen eine gleichmäßige Verteilung beider Zellpopulationen nach eintägiger Kultivierung feststellen (Abb. 28 A). Beide Zelltypen zeigten bereits deutliche Mitosefiguren, die auf hohe zelluläre Vitalität und Stoffwechselaktivität hindeuten (Abb. 28 B, D). Die rot angefärbten MSZ zeigten eine charakteristische Zytomorphologie von lang gestreckter und polygonaler Erscheinung. Zu dem waren sie deutlich größer als die grün angefärbten PCh (Abb. 28 C). Diese waren wie für Chondrozyten typisch klein und rundlich und bildeten bereits Zellnester aus (Abb. 28 D). In manchen Arealen waren um die MSZ zahlreiche PCh gruppiert und suchten intensiven Zell-Zell-Kontakt sowohl untereinander als auch zum anderen Zelltyp (Abb. 28 B).

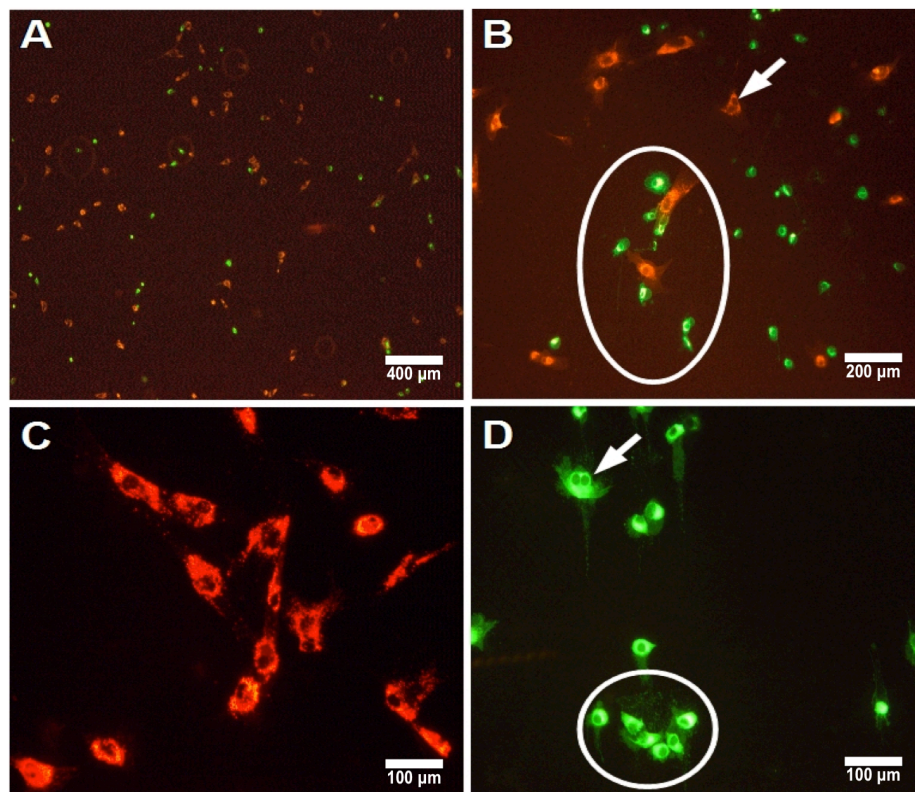


Abb. 28: Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen von Ko-Kultur aus MSZ (rot) und PCh (grün) mit PKH-Membranfärbung nach eintägiger Inkubation in Monolayer-Kultur mit normalem Medium. Es zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung beider Zelltypen über der gesamten Kultur (A). Deutliche Mitosefiguren beider Zellpopulationen deuten auf hohe Vitalität und zelluläre Aktivität hin (Pfeil B, D). Teils sind die PCh in Zellnestern (D, Kreis) oder um MSZ gruppiert (B, ovaler Kreis) und suchen intensiven Zell-Zell-Kontakt sowohl untereinander als auch zum anderen Zelltyp.

In stärkerer Vergrößerung zeichneten sich die engen Zell-Zell-Kontakte noch deutlicher aus. Teilweise kamen sich beide Zelltypen so nah, dass nur ein minimaler zellulärer Spalt sie voneinander trennte (Abb. 29 A-C). Darüber hinaus bildeten sowohl MSZ als auch PCh lange, ausgestreckte Pseudopodien, mit denen sie aktiv mit Zellen des anderen Zelltyps in Berührung kamen (Abb. 29 A-C). An manchen PCh war in direkter Nachbarschaft zu MSZ eine Änderung der Zellmorphologie von rundlich zu spindelförmig mit ausgeprägten Ausläufern an beiden Enden des Zellsoma sichtbar (Abb. 29). Mitosefiguren als Hinweis auf erhöhte zelluläre Aktivität konnten ebenfalls beobachtet werden (Abb. 29 C).

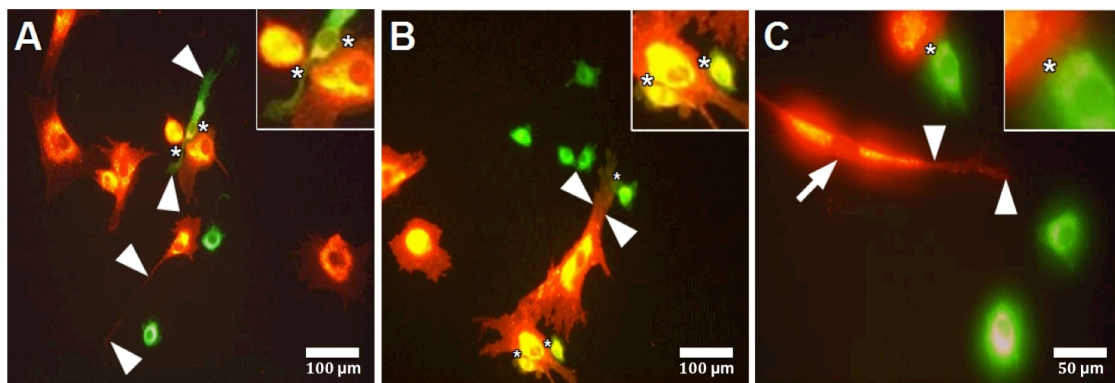


Abb. 29: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Ko-Kultur aus MSZ (rot) und PCh (grün) mit PKH-Färbung nach eintägiger Inkubation in Monolayer-Kultur mit normalem Medium. Enge interzelluläre Spalten deuten auf intensive Zell-Zell-Kommunikation hin (**Inlets ***). Beide Zellpopulationen bilden lange, ausgestreckte Pseudopodien (**Pfeilspitzen**), über die sie aktiv den interzellulären Kontakt zueinander suchen. Teilweise können Mitosefiguren als Hinweis auf erhöhte zelluläre Aktivität beobachtet werden (**C dicker Pfeil**).

Auch nach zweitägiger Kultivierung ergab die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ein ähnliches Bild. Weiterhin standen MSZ und PCh in engem zellulären Kontakt (Abb. 30 A-C). Ebenso waren lange, ausgedehnte Pseudopodien von beiden Zelltypen sichtbar, über die sie aktiv miteinander kommunizierten (Abb. 30 A, B). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass von einigen PCh in direkter Nachbarschaft zu MSZ vesikelähnliche Partikel ins Medium sezerniert wurden (Abb. 30 B, Inlets *). Umgekehrt war das Zytoplasma von manchen MSZ besonders auffällig granuliert (Abb. 30 A, C, Inlets). In direkter und näherer Umgebung von MSZ wurden zudem vermehrt PCh mit deutlichen Mitosefiguren beobachtet, die auf einen erhöhten Metabolismus der Chondrozyten hindeuten (Abb. 30 A, C).

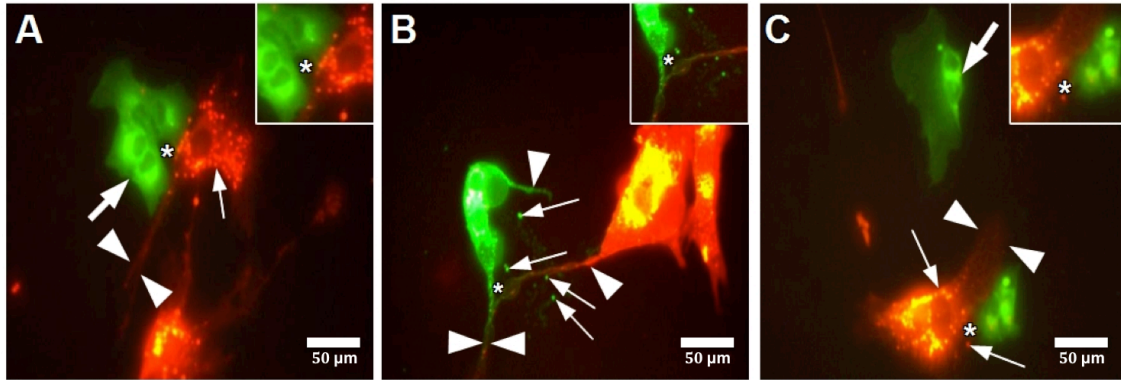


Abb. 30: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Ko-Kultur aus MSZ (rot) und PCh (grün) mit PKH-Färbung nach zweitägiger Inkubation in Monolayer-Kultur mit normalem Medium. Enger Zell-Zell-Kontakt (*) teils über Pseudopodien (Pfeilspitzen) ist weiterhin deutlich sichtbar (Inlets). Das Zytoplasma der MSZ ist gefüllt von auffälligen Granula (A, C, lange Pfeile). Teilweise werden Vesikel-ähnliche Partikel von PCh in Umgebung der MSZ ins Medium sezerniert (B, lange Pfeile, Inlet). PCh mit deutlicher Mitosefigur finden sich gehäuft in direkter Nachbarschaft von MSZ (A, C dicker Pfeil).

Am Tag 3 der Kultivierung ließ sich in der Übersichtsaufnahme zunächst eine starke Proliferation beider Zellpopulationen feststellen (Abb. 31). Zahlreiche MSZ und PCh mit ausgeprägter Mitosefigur teils in Zellclustern waren sichtbar. Enge interzelluläre Spalten zwischen MSZ und PCh machten die intensive Zell-Zell-Kommunikation besonders deutlich. Des Weiteren konnten erstmals zweifarbige Zellen als Hinweis auf aktiven Stoffaustausch beobachtet werden (Abb. 31 A). In der stärkeren Vergrößerung waren die engen interzellulären Kontakte und die Berührung beider Zelltypen mittels Pseudopodien noch deutlicher zu erkennen (Abb. 31 B). Darüber hinaus waren vesikelähnliche Partikel sichtbar, die von beiden Zellpopulationen sezerniert wurden (Abb. 31 B, C). Es fand sich einerseits rote Partikel, die den MSZ entstammen, auf oder in grünen PCh (Abb. 31 B). Andererseits wurden auch von PCh zahlreiche vesikuläre Partikel ins Medium der umliegenden MSZ sezerniert (Abb. 31 C).

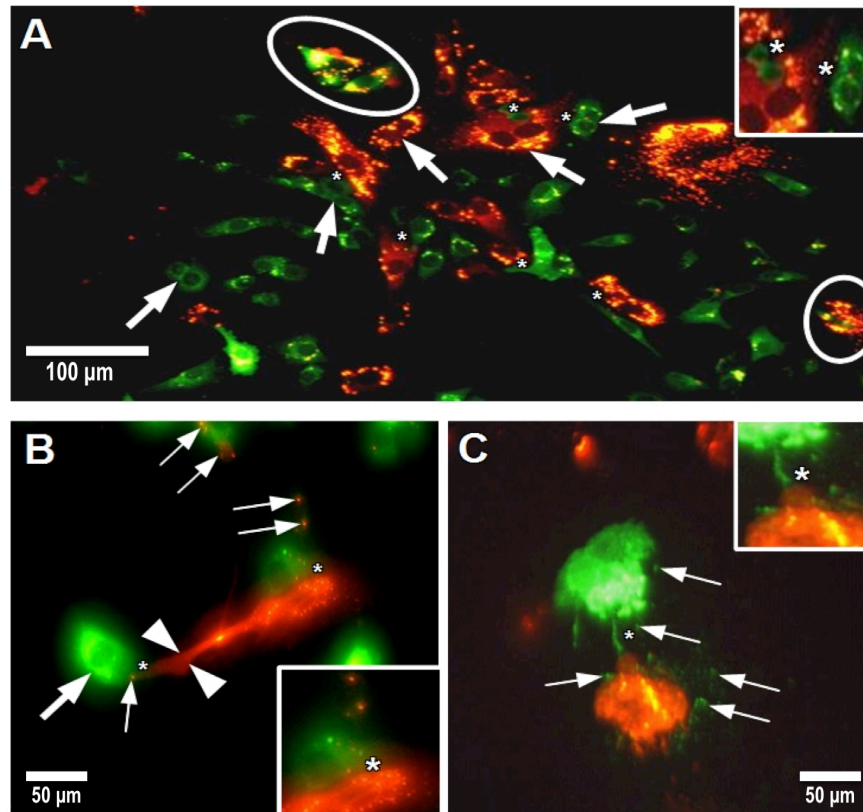


Abb. 31: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Ko-Kultur aus MSZ (rot) und PCh (grün) mit PKH-Färbung nach 3-tägiger Inkubation in Monolayer-Kultur mit normalem Medium. Starke Proliferation beider Zelltypen mit ausgeprägter Mitosefigur ist deutlich zu erkennen (**A, B dicke Pfeile**). Enge interzelluläre Spalten (***, Inlets**) und lang ausgestreckte Pseudopodien (**Pfeilspitzen**) deuten auf intensive Zell-Zell-Kommunikation hin. Vesikel ähnliche Partikel von MSZ und PCh (**B, C dünne Pfeile, Inlets**) sowie zweifarbige Zellen (**Kreis**) weisen auf aktiven Stoffaustausch hin.

Nach 4-tägiger Kultivierung war in der Übersichtsaufnahme die deutliche Proliferation von PCh mit eindeutiger Mitosefigur in der näheren Umgebung von MSZ zu erkennen (Abb. 32 A). Die intensive Zell-Zell-Kommunikation mittels Pseudopodien und in Form von engen interzellulären Spalten nahm weiter zu (Abb. 32 A-C). Erstmals waren teilweise kleine rote Zellen mit chondrozytoider Morphologie sichtbar (Abb. 32 A). In stärkerer Vergrößerung waren neben den engen Zell-Zell-Kontakten die reichlich vorhandenen, roten vesikulären Strukturen auf und in grünen PCh sehr auffällig. Umgekehrt fanden sich auch grüne vesikuläre Partikel in oder auf MSZ, die für einen aktiven Stoffaustausch zwischen beiden Zellpopulationen sprechen (Abb. 32 B-C).

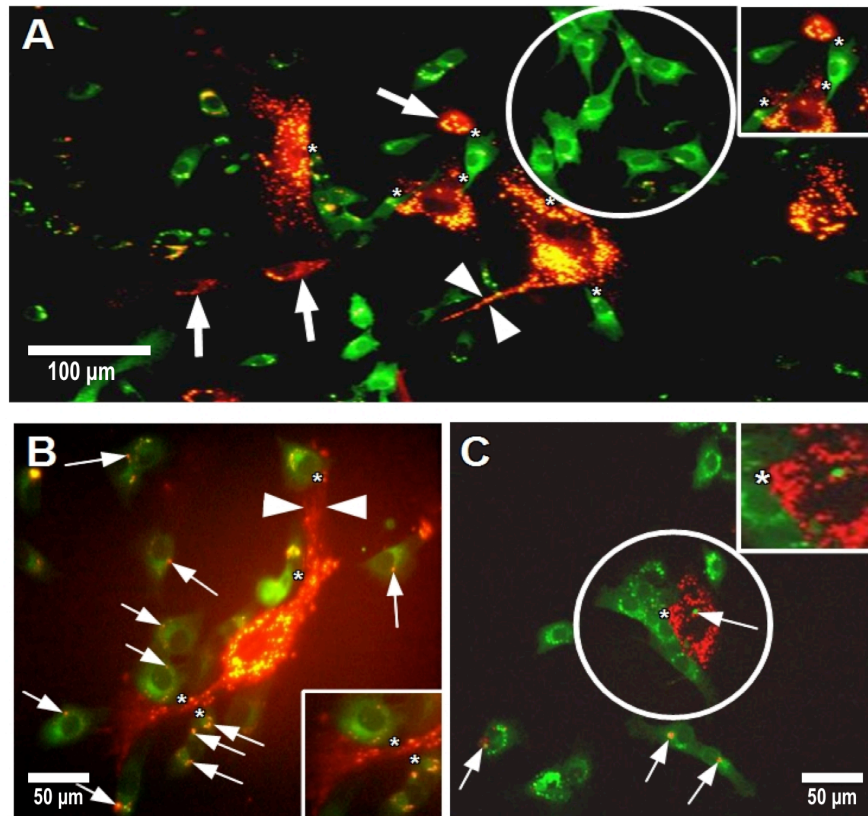


Abb. 32: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Ko-Kultur aus MSZ (rot) und PCh (grün) mit PKH-Färbung nach 4-tägiger Inkubation in Monolayer-Kultur mit normalem Medium. Proliferation der PCh in der Nähe von MSZ nahm deutlich zu (**A, C Kreis**). Erstmals sind rote abgerundete Zellen mit chondrozytoider Morphologie zu finden (**A, dicke Pfeile**). Weiterhin besteht intensive Zell-Zell-Kommunikation zwischen MSZ und PCh in Form von Pseudopodien (**A, B Pfeilspitzen**) und engen interzellulären Spalten (***, Inlets**). Vesikel-ähnliche Partikel als Hinweis auf aktiven Stoffaustausch finden sich in und auf beiden Zelltypen. (**B, C dünne Pfeile, Inlets**).

4.2.2. Endozytose-Exozytose-Assay

Da die Ergebnisse aus dem PKH-Monolayer-Versuch wichtige Hinweise auf aktiven vesikulären Stoffaustausch zwischen MSZ und PCh geliefert hatten, wurde im Anschluss ein Endozytose/Exozytose-Assay durchgeführt, um die beobachteten Stoffaustauschvorgänge eingehender zu analysieren. Konkret ging es darum zu klären, ob der Stoffaustausch zwischen beiden Zellpopulationen durch Endozytose und Exozytose von Vesikeln stattfand. Dazu wurden wie bereits erwähnt MSZ und PCh zunächst getrennt in Suspension mit an Goldpartikel gekoppelten Sekundärantikörpern

unterschiedlicher Größen für 10 min. inkubiert, MSZ mit 10nm und PCh mit 5nm großen Goldpartikeln und anschließend für 24h mit normalem Medium kultiviert.

Unter dem Transmissionselektronenmikroskop (Leica) war zunächst deutlich zu erkennen, dass die inkubierten Zellen Goldpartikel durch Endozytose aufgenommen hatten. In inkubierten MSZ befanden sich zahlreiche Goldpartikel sowohl auf der Membranoberfläche als auch im Zytoplasma (Abb.33 A, B, E, F). Darüber hinaus ließen sich besonders häufig Goldpartikel in Membranausstülpungen nachweisen (Abb. 33 C, D). Auffällige Zellorganellen wie Nucleus, Mitochondrien, raues ER und Vakuolen deuten auf hohen zellulären Metabolismus hin. Enge zelluläre Kontakte als Hinweis auf intensive Zell-Zell-Kommunikation waren ebenfalls sichtbar (Abb. 33 D, E).

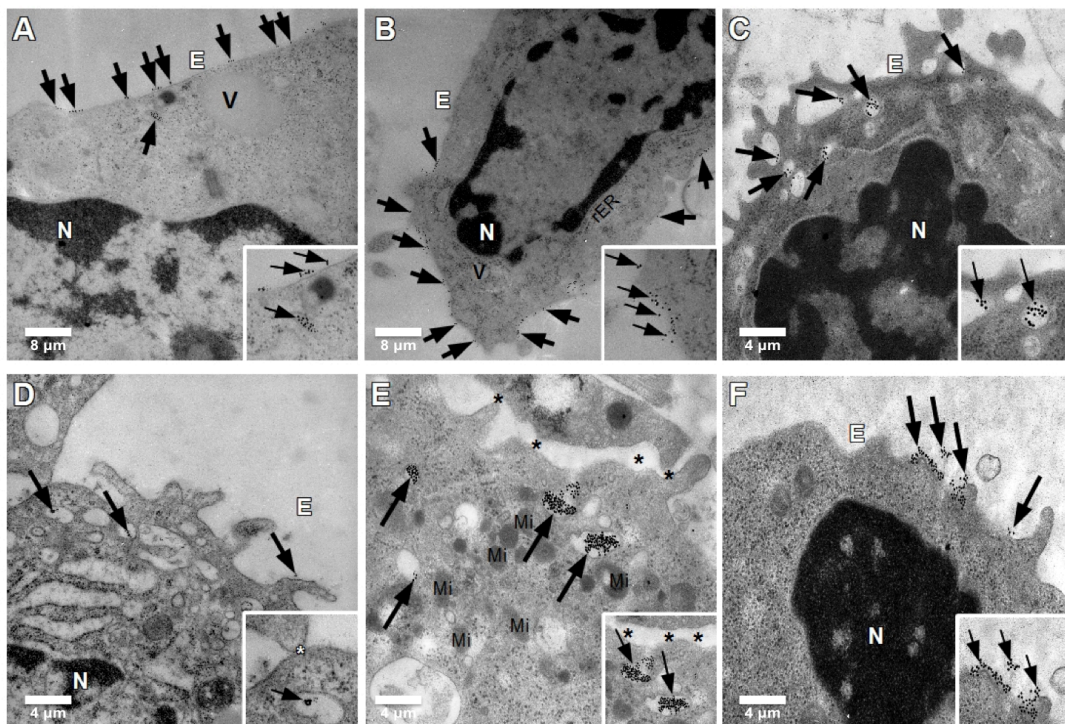


Abb. 33: TEM-Aufnahmen von MSZ präinkubiert mit an Goldpartikel (10nm) gekoppelten Sekundärantikörpern nach 24h in Suspension mit normalem Medium. In den Übersichtsaufnahmen (A – B) sind die membrangebundenen Goldpartikel von 10nm Größe (**Pfeile**) deutlich zu erkennen (**Inlets**). In der Vergrößerung (C – F) sind intrazellulär ebenfalls Goldpartikel (**dicke Pfeile**) vorwiegend in und um vakuoläre(n) Strukturen oder Membranausstülpungen (**Inlets**) deutlich sichtbar. Prominente Zellorganellen wie Nukleus (**N**), Mitochondrien (**Mi**), raues ER (**rER**) und Vakuolen (**V**) deuten auf hohe Zellaktivität hin. Enge Zell-Zell-Kontakte (*****) im Extrazellulärraum (**E**) sprechen für eine intensive zelluläre Kommunikation.

Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für die inkubierten primären Chondrozyten (PCh) gemacht. Sowohl auf der Zellmembran als auch intrazellulär waren die zahlreichen Goldpartikel von 5nm Größe deutlich zu erkennen, die durch Endozytose von der Zelle aufgenommen wurden (Abb. 34). Manche waren in Clustern angeordnet und nah am Zellkern zu finden (Abb. 34 C). Die große Anzahl von Mitochondrien und die auffällig großen Nuclei ließen ebenfalls eine hohe zelluläre Stoffwechselaktivität vermuten (Abb. 34 A – E).

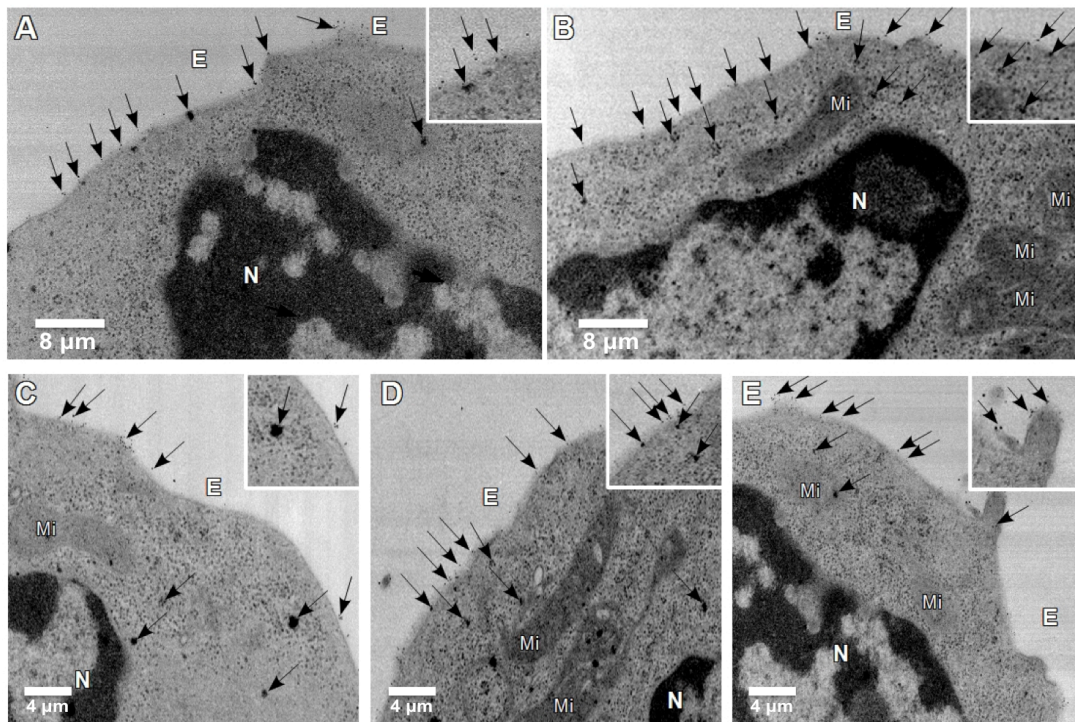


Abb. 34: TEM-Aufnahmen von PCh prä-inkubiert mit an Goldpartikel (5nm) gekoppelten Sekundärantikörpern nach 24h in Suspension mit normalem Medium. Goldpartikel von 5nm Größe (**Pfeile**) finden sich sowohl auf der Zellmembran als auch im Zytoplasma (**Inlets**). Nukleus (**N**), Mitochondrien (**Mi**), Extrazellulärraum (**E**).

Nach den Spülvorgängen wurden MSZ und PCh in Ko-Kultur mit gleichem Mischungsverhältnis zusammengebracht und für weitere 24h in Suspension mit normalem Medium kultiviert. Die immunelektronenmikroskopische Analyse der Ko-Kultur zeigte deutlich, dass als Folge der Exo- und Endozytose zahlreiche Goldpartikel beider Größen (5nm und 10nm) an und innerhalb derselben Zelle zu finden waren (Abb. 35 A – G, Insets). Die Goldpartikel befanden sich auf der Zellmembran (Abb. 35 A, B) und in hoher Konzentration in Membranein- und -ausstülpungen (Abb. 35 C – G, Insets). Ebenso kamen sie gehäuft an Stellen vor, an denen intensive

Zell-Zell-Kommunikation über Pseudopodien und enge Membranspalten zu beobachten war (Abb. 35 E, G). Große prominente Nuclei und die hohe Anzahl von Mitochondrien sprechen für eine hohe zelluläre Vitalität (Abb. 35 A, E – G).

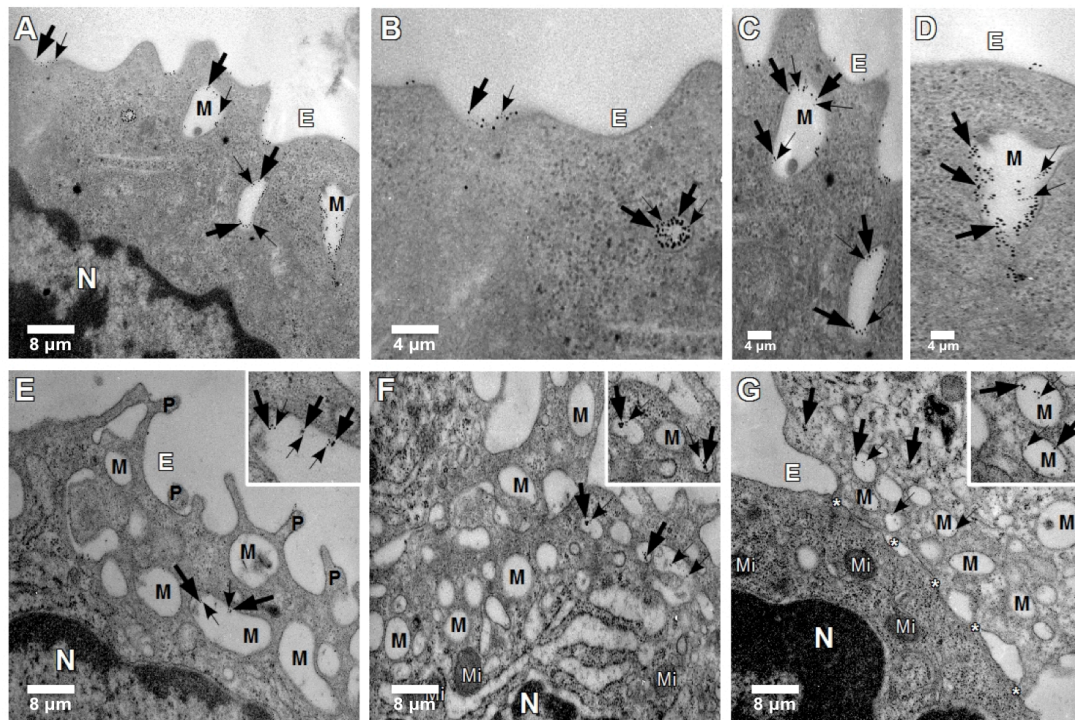


Abb. 35: TEM-Aufnahmen von 50/50 MSZ/PCh-Ko-Kultur prä-inkubiert mit an Goldpartikel (MSZ 10nm, PCh 5nm) gekoppelten Sekundärantikörpern nach 48h in Suspension mit normalem Medium. An und innerhalb derselben Zelle sind Goldpartikel von 5nm Größe (**dünne Pfeile**) und 10nm Größe (**dicke Pfeile**) zu erkennen (**Inlets**). Sie befinden sich teils auf der Zellmembran (**A – B**) und teils in Membranausstülpungen und – einschnürungen (**M**) (**C – G**). Konzentriert sind sie auch an Stellen zu finden, an denen intensive Zell-Zell-Kommunikation über Pseudopodien (**P**) und enge Membrankontakte (*) erkennbar ist (**E, G**). Nukleus (**N**), Mitochondrien (**Mi**), Extrazellulärraum (**E**).

5. DISKUSSION

Wie in der Einleitung erwähnt bietet die autologe Transplantation von adulten mesenchymalen Stammzellen in defekte Knorpelareale einen innovativen, zukunftsorientierten Ansatz zur Knorpelrekonstruktion. Die bereits erzielten, bisweilen bescheidenen Ergebnisse indes verdeutlichen die Notwendigkeit, weiterführende grundlegende Studien durchzuführen, um die komplexen Prozesse der chondrogenen Differenzierung von MSZ *in vitro* zu analysieren und daraus neue Erkenntnisse für die klinische Anwendung zu gewinnen. Diesem Grundgedanken folgend ging diese Arbeit deshalb den speziellen Fragen nach, ob die chondrogene Differenzierung von MSZ durch die Ko-Kultur mit primären Chondrozyten (PCh) in einem 3D-High-Density-Massenkulturmodell auch ohne Wachstumsfaktoren induziert werden könnte. Darüber hinaus galt es zu klären, welche Rolle dabei das Mischungsverhältnis zwischen MSZ und PCh spielt und welche interzellulären Vorgänge für die chondrogene Differenzierung von MSZ verantwortlich sein könnten.

5.1. Auswahl des Zellmaterials

Der Hund wird bereits seit Jahrzehnten als ein etabliertes Tiermodell in der experimentellen Forschung eingesetzt (Nelson-Rees et al., 1976). So dienen aus Hunden isolierte, kanine Zellen als Kultur- oder Tiermodell in verschiedensten medizinischen Forschungsbereichen, die von kardiovaskulären Erkrankungen (Kaufman et al., 1992), über die Erforschung und Produktion von Impfstoffen (Hu et al., 2011) bis hin zur neurologischen Problematik reichen (Kaoutzanis et al., 1993). Auch in Bezug auf Knorpelrekonstruktion und Arthroseforschung existiert heute bereits eine Fülle von Arbeiten, die sich des Hundes als Tier- oder Zellkulturmodell bedienen (Anderson et al., 1999; Breinan et al., 2001; Breinan et al., 1997; Chu et al., 2010; Cook et al., 2003; Gu et al., 2012; Morotomi et al., 2012; Nehrer et al., 1997; Oates et al., 1995; Shakibaei et al., 2012; Shortkroff et al., 1996; Sunaga et al., 2011; van Dyk et al., 1998). Vorteile des kaninen Materials gegenüber humanem liegen in der einfacheren Gewinnung, z.B. im Rahmen tierärztlicher Behandlungen, in übermäßigem Vorhandensein des Materials sowie in der kosteneffizienten Kultivierung, woraus eine größere Praktikabilität des Materials für Forschungszwecke resultiert. In der tierexperimentellen Forschung ist der Hund als Versuchsmodell bereits fest etabliert dank seiner im Gegensatz zu murinen

oder lapinen Kleintiermodellen ebenfalls limitierten intrinsischen Fähigkeit zur Knorpelregeneration, die mit der des Menschen vergleichbar ist (Chu et al., 2010). Dabei soll nicht unerwähnt bleiben, dass das Hundemodell wie jedes Tiermodell auch Schwächen aufweist. Sie sind bedingt zum einen durch die geringere Größe und Dicke (0,95 – 1,3mm) des kaninen Gelenkknorpels im Vergleich zu humanem, wodurch nur Knorpeldefekte bis zu einer Größe von 4mm analysiert werden können, was aber die klinisch relevante Größe von 10mm bei Menschen deutlich unterschreitet (Chu et al., 2010). Des Weiteren könnte die größere genetische Vielfalt bei Hunden mit uneinheitlichen Heilungspotenzialen die Konsistenz der Ergebnisse beeinträchtigen, weshalb die gewonnenen Erkenntnisse nicht vollständig auf Menschen übertragbar wären (Chu et al., 2010).

5.1.1. Kultivierung und Charakterisierung der isolierten kaninen primären Chondrozyten (kPCh) aus dem Knochenmark

Die für diese Arbeit verwendeten kaninen primären Chondrozyten (kPCh) wurden nach der Isolierung und vor Versuchsbeginn zunächst in Monolayer-Kultur kultiviert, um sicherzustellen, dass vitale Chondrozyten in ausreichender Anzahl für die Untersuchungen zur Verfügung stehen. Die Chondrozyten sollten in der Lage sein, sich *in vitro* zu vermehren und gleichzeitig ihr chondrogenes Potenzial aufrechtzuerhalten. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die isolierten Zellen sich an die Oberfläche der Zellkulturflaschen adhären können und *in vitro* eine typisch chondroblastäre Morphologie von rundlich oval bis spindelförmig exprimieren. Um nachzuweisen, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um Chondrozyten handelt, wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenz-Analyse auf wichtige chondrale Zellmarker untersucht. Dabei zeigte sich die Färbung positiv für knorpelspezifische Proteine wie Kollagen Typ II sowie wichtige knorpeltypische Zellmembran- und Zytoskelettproteine wie α_1 -Actinin, β_1 -Integrin und β -Actin (Hunter, 1995; Martel-Pelletier et al., 2008; Poole et al., 2001; Sjoblom et al., 2008; Umlauf et al., 2010). Koloniebildung und die Ausbildung zytoplasmatischer Fortsätze machen die intensive zelluläre Kommunikation deutlich. Das Erreichen der Konfluenz nach 72stündiger Kultivierung spiegelt die hohe zelluläre Proliferationsrate und daraus ableitend die Vitalität der Zellen wider. Allerdings unterliegt die Proliferation der Chondrozyten in Monolayer-Kultur zeitlichen

Einschränkungen. Mit zunehmender Passagezahl tritt das Phänomen der Dedifferenzierung auf, womit Chondrozyten ihre chondrogenen Eigenschaften allmählich verlieren (Benya et al., 1982; Mayne et al., 1976; Shakibaei et al., 1993). Sie ändern ihren charakteristisch chondrogenen Phänotyp und nehmen eine fibroblastoide Erscheinung an. Damit einhergehend wird auch das Proteinsyntheseprogramm der Chondrozyten dahingehend geändert, dass statt knorpeltypischen Proteinen wie Kollagen Typ II und CSPG Apoptose-Marker wie aktivierte Caspase-3 sowie Kollagen Typ I produziert werden (Cheng et al., 2012; Schulze-Tanzil et al., 2004; Shakibaei et al., 1993). Der Prozess der Dedifferenzierung kann noch bis zur Passage vier aufgehalten und teilweise umgekehrt werden, wenn die Zellen in ein dreidimensionales Kulturmodell wie die 3D-High-Density-Massenkultur überführt werden (Schulze-Tanzil et al., 2002). Dieses Redifferenzierungspotenzial mit der Synthese von knorpeltypischen Proteinen ist jedoch ab Passage fünf nicht mehr möglich (Schulze-Tanzil et al., 2002). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit nur Zellen bis zur Passage vier für die Untersuchungen verwendet.

Mit Hilfe der oben erwähnten Kulturbedingungen konnte somit gewährleistet werden, dass eine zuverlässig reproduzierbare Zellpopulation von vitalen proliferationsfähigen Chondrozyten mit stabilem chondrogenem Potenzial in hoher Anzahl für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Verfügung stand.

5.1.2. Kultivierung, Charakterisierung und Differenzierung der isolierten kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) aus dem Knochenmark

Wie bereits oben für die primären Chondrozyten erwähnt, galt es für die MSZ ebenfalls, zunächst eine vitale proliferationsfähige Zellpopulation mit stabilem Differenzierungspotenzial in ausreichender Menge zu Versuchszwecken zu kultivieren. Daher wurden die aus dem Knochenmark von Hunden isolierten MSZ zunächst in Monolayer-Kultur kultiviert und anschließend den speziellen Kriterien entsprechend charakterisiert.

In Monolayer-Kultur konnte gezeigt werden, dass die isolierten Zellen sich erstens an Plastik adhären können und zweitens eine für Stammzellen typische polymorphe

Morphologie von polygonaler bis spindelförmiger Erscheinung mit teils lang gestreckten Pseudopodien exprimieren. Sie sind vital und proliferationsfähig und lassen sich nach Erreichen der Konfluenz passagieren, womit sie ihre Kultivierbarkeit *in vitro* demonstrierten. Im nächsten Schritt wurden die isolierten MSZ gemäß den Kriterien des *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) charakterisiert, um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um multipotente MSZ handelt (Csaki et al., 2007; Dominici et al., 2006). Die erste Voraussetzung zur Charakterisierung der MSZ wurde durch die bereits demonstrierte Kultivierbarkeit der isolierten Zellen *in vitro* erfüllt. In einem weiteren Schritt wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen, dass die isolierten Zellen stammzelltypische Zelloberflächenmarker wie CD105⁺ und CD90⁺ exprimieren, während sie für hämatopoetische Zelloberflächenmarker CD45⁻ und CD34⁻ negativ sind (Csaki et al., 2007; Dominici et al., 2006; Mageed et al., 2007; Mareddy et al., 2007). Das dritte essentielle Merkmal der MSZ, sich *in vitro* unter adäquaten Kulturbedingungen zu verschiedenen Zelllinien differenzieren zu lassen (Conget et al., 1999; Csaki et al., 2007; Dominici et al., 2006; Pittenger et al., 1999), konnte in dieser Arbeit durch die Differenzierung der isolierten Zellen zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten veranschaulicht werden. Dieses multipotente Differenzierungspotenzial der isolierten MSZ wurde mittels Lichtmikroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie und Westernblot-Analyse nachgewiesen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die mit osteogenem Differenzierungsmedium induzierten MSZ typisch osteoblastäre Eigenschaften exprimierten. Unter dem Lichtmikroskop zeigte sich eine morphologische Änderung der MSZ zu kurzen, sternenförmigen osteoblastoiden Zellen. Diese neu differenzierten Zellen lagerten wie ausdifferenzierte Osteoblasten mineralisierte Knötchen in der EZM ab, die durch positive von-Kossa-Färbung in der lichtmikroskopischen Darstellung nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren zeigte die ultrastrukturelle Analyse mittels TEM in den osteogen induzierten MSZ-Kulturen große sternenförmige Zellen mit hohem Anteil von Euchromatin im Nukleus und reichhaltigen Zellorganellen im strukturierten Zellverband eingebettet in eine dicke gut organisierte EZM aus Fibrillenbündeln. Zuletzt konnte noch die Expression osteogen spezifischer Proteine in den neu differenzierten Zellen mittels Immunoblotting verifiziert werden, da das wichtigste extrazelluläre Matrixprotein des Knochengewebes Kollagen Typ I und der spezifische Transkriptionsfaktor der

Osteogenese Cbfa-1(Runx2) eindeutig nachzuweisen waren (Ducy, 2000; Katagiri et al., 2002; Lian et al., 2004). Diese morphologischen und genotypischen Merkmale weisen eindeutig nach, dass eine osteogene Differenzierung der hier untersuchten MSZ stattgefunden hat.

Die adipogene Differenzierung der isolierten MSZ konnte zunächst lichtmikroskopisch mittels Oil-Red-O Färbung dargestellt werden, da in den adipogen induzierten MSZ intrazelluläre Lipidvakuolen nachweisbar waren, wie sie auch in primären Adipozyten vorkommen (Hong et al., 2008; Pittenger et al., 1999; Toseland et al., 2001). Dies konnte durch die TEM-Analyse ebenfalls eindeutig bestätigt werden, da die reichlich vorhandenen multilokulären Fettvakuolen dabei besonders prominent erscheinen. Für eine erfolgreiche adipogene Differenzierung spricht überdies, dass unter TEM Zellen von länglicher adipozytoider Morphologie mit großem Nukleus, gut entwickelten Zellorganellen und Mitochondrien vom Lamina Cristae Typ in den adipogen induzierten MSZ deutlich zu Tage treten. Diese plurivakuolären Zellen mit auffälligem Nukleus und einer Fülle an Mitochondrien erinnern an Adipozyten von braunem Fettgewebe *in vivo* (Enerback, 2009). Mittels Western-Blot-Analyse konnten auf der Proteinebene ebenfalls fettspezifische Markerproteine in den adipogen induzierten MSZ-Kulturen identifiziert werden wie z.B. das vom Fettgewebe sezernierte metabolisch aktive Protein Adiponektin (Oh, D. K. et al., 2007) und der adipogene Transkriptionsfaktor PPAR- γ (Fajas et al., 1997). Aus diesen verschiedenen positiven Nachweisergebnissen konnte also mit hoher Sicherheit geschlossen werden, dass die induzierten MSZ sich zu Adipozyten differenziert haben.

Die Fähigkeit der isolierten MSZ zur chondrogenen Differenzierung wurde im ersten Schritt lichtmikroskopisch durch Alcian-Blau-Färbung der knorpelspezifischen Proteoglykane (CSPG), Hauptkomponente der EZM des hyalinen Gelenkknorpels, in den chondrogen induzierten MSZ-3D-HD-Massenkulturen nachgewiesen (Kiani et al., 2002; Knudson et al., 2001; Nap et al., 2008; Poole et al., 2001). Obwohl die Intensität der Alcian-Blau-Färbung der induzierten MSZ-Kulturen zwar schwächer als die der Positivkontrolle aus nativem Knorpelgewebe ausfiel, überstieg sie jedoch die der unbehandelten MSZ-HD-Kulturen im Vergleich deutlich, so dass eine ausreichend nachweisbare Menge an CSPG in den induzierten MSZ-Kulturen synthetisiert worden sein müsste. Unter TEM zeigte sich zudem in der MSZ-Massenkultur durch die

chondrogene Induktion eine kartilaginäre Ultrastruktur mit kuboiden bis ovalen teils paarweise gruppierten chondroblastären Zellen, die an Chondrone *in vivo* erinnern. Die neu synthetisierten chondroblastoiden Zellen weisen einen hohen Anteil an Euchromatin im auffällig großen Nukleus auf, verfügen über ausgeprägte Zellorganellen wie Mitochondrien und sind teils gefüllt mit zahlreichen Vesikeln. Diese zytomorphologischen Merkmale weisen auf eine hohe zelluläre Syntheseaktivität hin, die sich in der Produktion der mächtigen hoch strukturierten fein fibrillären EZM widerspiegelt. Darüber hinaus sind die Zellen umgeben von Schichten fibroblastoider Zellen in der Peripherie eingebettet in eine EZM aus dicken Matrixfibrillen, die dem Perichondrium *in vivo* sehr ähneln. Mittels Immunoblotting konnte überdies die Expression knorpeltypischer Proteine der EZM wie Kollagen Typ II, CSPG und des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox-9 in den induzierten MSZ-Kulturen nachgewiesen werden (Akiyama et al., 2011; de Crombrughe et al., 2000; Huang et al., 2002; Lefebvre et al., 1998; Martel-Pelletier et al., 2008; Poole et al., 2001; Umlauf et al., 2010). Diese morphologischen, ultrastrukturellen und zytometabolischen Charakteristika deuten darauf hin, dass die isolierten MSZ unter adäquaten Kulturbedingungen zur Chondrogenese befähigt sind.

Da die isolierten Zellen somit allen oben erwähnten Kulturbedingungen und Charakterisierungskriterien gerecht wurden, kann mit hoher Sicherheit davon ausgegangen werden, dass nur echte vitale multipotente MSZ mit stabilem Differenzierungspotenzial in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen eingesetzt wurden.

5.2. Auswahl der Methoden

5.2.1. 3D-High-Density-Massenkultur und Chondrogenese

Zellkondensation spielt eine entscheidende Rolle in der Skelettentwicklung während der Embryogenese und geht jeglicher Form der Zelldifferenzierung und Morphogenese voraus (Hall et al., 1995, 2000; Loty et al., 2000). Chondrogenese aus mesenchymalen Progenitorzellen *in vivo* wird ebenfalls initiiert durch die Kondensation der Zellen zu dreidimensionalen Aggregaten, woraus sich zunächst Chondroblasten und im weiteren Verlauf Knorpelgewebe entwickeln (Denker et al., 1999; Hall et al., 1995). Hierbei wird

eine Reihe von Matrixproteinen und Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen wie Fibronectin (Denker et al., 1999; Dessau et al., 1980), Versikan (Hall et al., 1995, 2000), Tenascin (Denker et al., 1999; Hall et al., 2000; Mackie et al., 1987), Syndekan (Hall et al., 2000), N-Cadherin (Denker et al., 1999; Haas et al., 1999; Oberlender et al., 1994), N-CAM (Denker et al., 1999; Hall et al., 2000; Widelitz et al., 1993), Heparan-sulfat Proteoglykan (Hall et al., 1995), CSPG (Hall et al., 1995, 2000), Hyaluronsäure und ihren Rezeptor CD44 (Denker et al., 1999; Knudson et al., 1985; Toole, 1972) sowie Hyaladherine (Hall et al., 2000) und Integrine (Shakibaei, 1998) exprimiert, die die interzelluläre Kommunikation und Interaktion während der Chondrogenese vermitteln (Denker et al., 1999; Hall et al., 1995, 2000).

Dreidimensionale High-Density Kulturen wie die Pellet- oder Massenkultur haben sich bereits als zuverlässiges Kultursystem in der Differenzierung von Binde- und Stützgewebszellen aus mesenchymalen Progenitorzellen etabliert (Csaki et al., 2009; Neumann et al., 2007; Schmitt et al., 2003; Schneider, P. R. et al., 2011). Sie sind geeignet, um Chondrogenese zu studieren, da durch die Kondensation und Aggregation der Zellen die Bedingungen in einem dreidimensionalen Kulturmodell denen während der prächondrogenen Kondensationsphase der Embryogenese *in vivo* sehr ähneln (Zhang et al., 2010). Eine initial hohe Zelldichte trägt maßgeblich zur Induktion der Chondrogenese bei (Caplan, 2005). Darüber hinaus begünstigt und verstärkt das 3D-Mikromillieu gegenüber dem der Monolayer-Kultur die chondrogene Differenzierung von Stammzellen insbesondere am Beginn der Chondrogenese (Toh et al., 2007). Dies wird dadurch erklärt, dass zelluläre Prozesse wie Zell-Zell-Interaktion, interzelluläre Kommunikation und zellulärer Stoffaustausch durch das 3D-Mikromillieu besonders gefördert und unterstützt werden (Denker et al., 1999; Haas et al., 1999; Lettry et al., 2010; Loty et al., 2000; Schroter-Kermani et al., 1991; Schulze-Tanzil et al., 2002; Toh et al., 2007). Des Weiteren ermöglicht die Ernährung der Massenkulturen per Diffusion an der Medium-Luft-Grenze eine möglichst naturgetreue Imitation der physiologischen Ernährungsweise des avaskulären Gelenkknorpels *in vivo* (Huber et al., 2000; Kuettner, 1992). Es konnte bereits gezeigt werden, dass galline mesenchymale Progenitorzellen der embryonalen Extremitätenknospe sich in High-Density Kultur zu Chondrozyten differenzieren ließen (Kulyk et al., 2000; Mello et al., 1999). Ebenso konnte chondrogene Differenzierung von kaninen (Csaki et al., 2007), equinen (Lettry et al., 2010), murinen (Haas et al., 1999), bovinen (Bosnakovski et al., 2004) und humanen

(Schmitt et al., 2003; Zhang et al., 2010) MSZ in 3D-High Density Kulturen erfolgreich durchgeführt werden.

Das 3D-High-Density Massenkulturmodell stellt somit ein einfaches, zuverlässig reproduzierbares, effizientes und den physiologischen Bedingungen vergleichbares Kultursystem, um chondrogene Differenzierung in MSZ zu induzieren und alle Aspekte der Chondrogenese *in vitro* zu studieren.

5.2.2. MSZ/PCh- Ko-Kultur und Chondrogenese

Die *in vitro* Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu chondrozytären Gewebszellen konnte bereits in verschiedenen Tier- und humanen Untersuchungsmodellen reproduziert werden. So konnten unter anderem bovine (Bosnakovski et al., 2004), equine (Hegewald et al., 2004), galline (Quarto et al., 1997), humane (Li, Z. et al., 2009; Li, Z. et al., 2010; Mackay et al., 1998; Yoo et al., 1998), kanine (Csaki et al., 2007; Kadiyala et al., 1997), lapine (Johnstone et al., 1998), murine (Grigoriadis et al., 1996) und ovine (Williams et al., 2003) MSZ oder mesenchymale Progenitorzellen mit Hilfe chondrogenen Differenzierungsmediums mit Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 , - β_3 und Dexamethason erfolgreich zu Chondrozyten beziehungsweise kartilaginärem Gewebe differenziert werden.

In vivo befinden sich adulte Stammzellen in einer definierten Mikroumgebung im jeweiligen Gewebe, die als „Stammzellennische“ bezeichnet wird (Birmingham et al., 2012; Kuhn et al., 2010; Li, L. et al., 2005; Schofield, 1978; Song et al., 2006). Schofield beschrieb erstmals die Stammzellennische, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie erstens einen ruhenden Stammzellenpool beherbergt, zweitens die Proliferation der Stammzellen reguliert und drittens ihre Differenzierung zu einem bestimmten Zelltyp steuert (Birmingham et al., 2012; Kuhn et al., 2010; Schofield, 1978). Studien zeigen, dass mesenchymale Stammzellen sich in fast allen adulten Geweben in einer perivaskulären Nische befinden, von der aus sie die Homöostase des Gewebes durch eine austarierte Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung regulieren (Crisan et al., 2008; da Silva Meirelles et al., 2006; Kuhn et al., 2010; Li, L. et al., 2005; Shi et al., 2003). Im Knochenmark sind sie umgeben von einer Vielzahl an verschiedenen

Zelltypen wie hämatopoetischen Stammzellen, ausreifenden myeloischen und lymphatischen Blutbestandzellen, Osteoklasten, Fibroblasten, Endothelzellen, Adipozyten und Osteozyten (Birmingham et al., 2012; Dorshkind, 1990; Kuhn et al., 2010; Yin et al., 2006). Hierbei wird das Verhalten der Stammzellen maßgeblich beeinflusst von sowohl extrinsischen Faktoren als auch intrinsischen Signalen (Kuhn et al., 2010; Li, L. et al., 2005). Vielfältige Interaktionen mit den umgebenden Zellen in der lokalen Umgebung durch bspw. direkten Zell-Zell-Kontakt oder Austausch von löslichen Wachstumsfaktoren und Zytokinen sowie Kommunikation mit extrazellulären Matrixproteinen (Jones, D. L. et al., 2008; Kuhn et al., 2010) scheinen ebenso die Differenzierung der MSZ zu regulieren wie die In- oder Aktivierung bestimmter „Differenzierungsgene“ wie z. B. *AFAP*, *DKK3*, *FZD7*, *PTPRF* und *RAB3B* (Kuhn et al., 2010; Song et al., 2006).

Die Ko-Kultivierung von Stammzellen mit einem anderen Zelltyp setzt an den beobachteten *in vivo* Vorgängen der wechselseitigen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen an und versucht die physiologischen Bedingungen innerhalb der Stammzellennische *in vitro* zu simulieren. Studien belegen bereits, dass die Differenzierung der Stammzellen hierdurch positiv beeinflusst wird. Ni et al. konnte beispielsweise zeigen, dass adulte Knochenmarksstromazellen (BMSCs) aus Ratten ko-kultiviert mit olfaktorischen Schwannzellen (OECs) neuronenspezifische Morphologie und Markerproteine exprimieren (Ni et al., 2010). Murine embryonale Stammzellen (ESCs) konnten durch Ko-Kultur mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMECs) zu Pankreasvorläuferzellen und Insulin produzierenden β -Zellen differenziert werden (Talavera-Adame et al., 2011). Auch zeigten embryonale Stammzellen (ESCs) in der Ko-Kultur mit Hepatozyten (HEPA-1C1c7) deutlich verstärkte chondrogene Differenzierungsmerkmale (Lee, H. J. et al., 2008). Für die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteozyten, Chondrozyten und Tenozyten existieren bis dato ebenfalls zahlreiche Untersuchungen, die den positiv induzierenden Effekt des Ko-Kultur-Modells veranschaulichen (Birmingham et al., 2012; Csaki et al., 2009; Giovannini et al., 2010; Lettry et al., 2010; Luo, Q. et al., 2009; Schneider, P. R. et al., 2011). Es konnte bereits gezeigt werden, dass das chondrogene Differenzierungspotential von humanen (Acharya et al., 2012; Bian et al., 2011; Chen, W. H. et al., 2009) und equinen (Lettry et al., 2010) MSZ allein durch die Ko-Kultur mit primären Chondrozyten (PCh) der jeweiligen Spezies verstärkt werden kann. Ebenso

konnte Tapp et al. in einem xenogenen Ko-Kulturmodell aus MSZ des Fettgewebes (AD-MSC) der Sandrennmaus mit humanen Annuluszellen deutlich erhöhte Proteoglykanproduktion feststellen (Tapp et al., 2008).

Das Ko-Kultur-Modell ist somit ein viel versprechender, neuer und zuverlässiger Ansatz, um durch Simulation und Förderung der *in vivo* Verhältnisse Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen *in vitro* zu induzieren und zu analysieren, um daraus valide Rückschlüsse auf Stammzelldifferenzierung zu ziehen.

5.2.3. PKH-Fluoreszenz- Membranfärbung

Der Einsatz der lipophilen PKH-Fluoreszenz-Membranfarbstoffe PKH26 und PKH67 benannt nach ihrem Erstbeschreiber Paul Karl Horan (Horan et al., 1989) ist eine schnelle und leicht anwendbare Zellmarkierungsmethode, die dank der Interkalation des Farbstoffs mit der Zellmembran unselektiv nahezu jeden Zelltyp einer beliebigen Spezies durch Fluoreszenz im 488nm bis 503nm Wellenlängenbereich sichtbar macht (Horan et al., 1990; Horan et al., 1989; Wallace et al., 2007). Ihre chemische Struktur bestehend aus einem langen 14 – 22 Kohlenstoffatome umfassenden gesättigten aliphatischen Kohlenwasserstoffschwanz verbunden mit dem kationischen somit polaren Fluorochromkopf verleiht den PKH-Farbstoffen die Eigenschaft, irreversibel in Lipidregionen der Zellmembran inserieren zu können, ohne die Zellfunktionen wesentlich zu beeinflussen (Givan, 2007; Horan et al., 1990; Horan et al., 1989; Rousselle et al., 2001; Tario et al., 2007; Wallace et al., 2007; Wallace et al., 1993). Nach Aufnahme in die Zellplasmamembran wird der Farbstoff internalisiert und verteilt sich gleichmäßig im Zytoplasma (Rousselle et al., 2001). Alle Membran tragenden Zellorganellen wie z.B. der Golgi-Apparat, Vesikel oder Endo-/Lysosomen werden ebenfalls angefärbt wie auch die Doppelmembran des Zellkerns (Rousselle et al., 2001). Dies macht u.a. auch den interzellulären Austausch von Vesikeln sichtbar. Durch die mangelnde Zytotoxizität sind sie für *in vitro* und *in vivo* Studien bestens geeignet (Horan et al., 1990; Parish, 1999; Rousselle et al., 2001). Einmal in die Lipid-Bilayer der Zellmembran integriert sind PKH-Farbstoffe äußerst stabil dank der stark hydrophoben nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten des Farbstoffs und jenen der Membranphospholipide (Tario et al., 2007; Wallace et al., 2007). Daher wurde weder ein Auslaufen noch ein Austausch des Farbstoffs zwischen

gefärbten und ungefärbten Zellen in Ko-Kultur beobachtet (Horan et al., 1990; Horan et al., 1989; Tario et al., 2007). Diese Membranretentionsstabilität erlaubt dem Untersucher, die angefärbten Zellen sowohl über einen längeren Zeitraum zu beobachten als auch ihre Proliferation zu messen, da die Fluoreszenzintensität proportional zur Zellteilung abnimmt (Parish, 1999; Tario et al., 2007). Beispielsweise kann die PKH-Fluoreszenzintensität in sich nicht teilenden Zellpopulationen über Wochen bis Monate stabil bleiben (Horan et al., 1990; Wallace et al., 2007; Young et al., 1995), während sie sich in proliferierenden Kolonien mit jeder Zellgeneration halbiert (Horan et al., 1990; Parish, 1999; Rousselle et al., 2001; Wallace et al., 2007). Da der PKH-Farbstoff selbst den zellulären Proliferationsprozess nicht beeinträchtigt (Rousselle et al., 2001), kann aus der Geschwindigkeit der Fluoreszenzabschwächung somit auf die Teilungsrate und daraus ableitend die Vitalität der Zellen geschlossen werden, um so Zellproliferation in heterogenen Populationen zuverlässig zu überwachen (Boutonnat et al., 2000; Boutonnat et al., 1998; Givan et al., 1999; Rousselle et al., 2001; Wallace et al., 2007). Verglichen mit den ebenfalls häufig verwendeten Membranfarbstoffen durch kovalente Proteinbindung wie dem Carboxyfluorescein (CFSE) bietet die PKH-Färbung dank ihrer Funktionsweise außerdem den Vorteil, Zellproliferationsstudien umgehend starten zu können, ohne wie bei der Anwendung von CFSE auf die Fluoreszenzstabilisierung warten zu müssen (Tario et al., 2007; Wallace et al., 2007).

Im Gegensatz zu den Stärken bestehen die Einschränkungen der PKH-Farbstoffe in ihrer Lipophilie und ihrer nicht-kovalenten Bindung mit der Zellmembran, wodurch fettlösende Reagenzien zur Zell- und Gewebsfixierung wie Ethanol, Methanol und Aceton sie leicht auswaschen können (Wallace et al., 2007). Zudem ist die Methode durch ihre Funktionsweise der Insertion in Zellmembran vom richtigen Verhältnis zwischen Farbstoff- und Zellkonzentration stark abhängig (Wallace et al., 2007). Eine zu hohe Farbstoffkonzentration relativ zur Zellzahl könnte zum Einen eine Verschiebung des Fluoreszenzspektrums verursachen (Fischer, K. et al., 2002; Wallace et al., 2007) und zum Anderen die Membranintegrität so empfindlich stören, dass sie zu konsekutiven Funktionseinbußen führt (Wallace et al., 2007). Deshalb müssen im Vorfeld Farbstoffkonzentration und Zellzahl präzise definiert sein, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (Wallace et al., 2007). Zuletzt könnten noch die Spektraleigenschaften der PKH-Farbstoffe ihre Anwendung in üblicherweise ebenfalls

auf Fluoreszenz basierenden durchflusszytometrischen Untersuchungen (FACS) limitieren, wie es bei der simultanen Anwendung von PKH26 und Phycoerythrin (PE) der Fall wäre, da beide Stoffe im FL2 (576/26)-Filterspektrum fluoreszieren (Tario et al., 2007).

Nichts desto trotz kamen PKH-Farbstoffe aufgrund ihrer vielfach vorteilhaften molekularbiologischen Eigenschaften bereits in zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Zelltracking- und Proliferationsstudien zum Einsatz (Kempf et al., 1998; Ladd et al., 1997; Melnicoff et al., 1988; Morimoto et al., 2005; Parish, 1999; Pricop et al., 1997; Sugito et al., 2004; Wallace et al., 1993; Yamamura et al., 1995a; Yamamura et al., 1995b). So wurden sie beispielsweise in immunologischen Untersuchungen verwendet, um die Proliferation bestimmter Subpopulationen von T-Lymphozyten nach Antigenstimulation zu dokumentieren (Bercovici et al., 2003) oder die Migration von gamma-delta+ T-Lymphozyten von iliakalen Lymphknoten zur Rektum- und Vaginamukosa in Makaken zu verfolgen (Lehner et al., 2000) und das Homing von mononukleären Zellen *in vivo* zu beobachten (Mitchell et al., 1998). Ebenso wurden Stammzellen und Chondrozyten mit PKH-Farbstoffen angefärbt, um ihre Migrations-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten zu analysieren (Chawla et al., 2006; Csaki et al., 2009; Lanzkron et al., 1999; Schneider, P. R. et al., 2011). So konnte Csaki et al. z.B. mittels PKH-Membranfärbung Interaktionen zwischen kaninen MSZ und Osteozyten in Monolayer-Ko-Kultur darstellen (Csaki et al., 2009). Ebenso konnte Schneider et al. mit PKH-Farbstoffen die intensive Kommunikation zwischen kaninen MSZ und Tenozyten *in vitro* sichtbar machen (Schneider, P. R. et al., 2011).

So haben PKH-Fluoreszenz-Membranfarbstoffe dank ihrer Spektraleigenschaften, biochemischen Stabilität und ausgezeichneten Membranretentionsfähigkeit sich als ein wertvolles und unverzichtbares Werkzeug in Zellkulturstudien etabliert, das es ermöglicht, sicher, zuverlässig und ohne großen Aufwand zelluläre Prozesse wie Zellmigration, Zell-Zell-Interaktion, Vesikelaustausch und Zellteilung über einen längeren Zeitraum *in vitro* zu beobachten als auch sie *in vivo* zu studieren.

5.2.4. Endozytose-Exozytose-Assay

Endozytose und Exozytose sind fundamentale zelluläre Prozesse, die Zellüberleben, Zellfunktionen, Zellwachstum und -Differenzierung, zelluläre Signaltransduktion und Zellmigration entscheidend beeinflussen und regulieren (Mellman, 1996; Miaczynska et al., 2008; Mukherjee et al., 1997; Willingham et al., 1984).

Endozytotische und exozytotische Vorgänge von Stammzellen und Chondrozyten sind ebenfalls bekannt. So konnte Okafor et al. beispielsweise nachweisen, dass humane MSZ Titanpartikel via Endozytose aufnehmen können, wodurch die Zellproliferation reduziert, die osteogene Differenzierung unterdrückt und verstärkt Apoptose induziert wird (Okafor et al., 2006). Stevens et al. konnte an murinen Chondrozyten demonstrieren, dass Proteoglykane per Exozytose von Chondrozyten ins Medium sezerniert werden bzw. dass die Exozytose von ^{35}S -Proteoglykan durch Diethylcarbamazin (DEC) inhibiert wird (Stevens et al., 1985). Zell-Zell-Interaktion in Form von interzellulärem Austausch von löslichen Faktoren via Endo- und Exozytose konnte zwischen kaninen MSZ und Tenozyten in Ko-Kultur beobachtet werden und scheint eine wichtige Rolle bei der tenogenen Differenzierung von MSZ zu spielen (Schneider, P. R. et al., 2011).

Endozytose und Exozytose sind also gängige zelluläre Mechanismen, die sowohl wichtige Zellfunktionen wie Stoffwechsel, Differenzierung und Migration beeinflussen als auch eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung interzellulärer Kommunikation und Signaltransduktion spielen. Mittels eines Endozytose-Exozytose-Assays könnten somit eventuelle Zell-Zell-Kommunikation via Stoffaustausch zwischen MSZ und PCh leicht nachgewiesen und zugleich die zugrunde liegenden zellulären Prozesse optimal beleuchtet werden.

5.3. Auswirkung der Ko-Kultur aus MSZ und PCh in 3D-HD-Massenkultur auf die chondrogene Differenzierung von MSZ

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals im kaninen Kulturmodell das chondrogene Induktionspotenzial von primären Chondrozyten (PCh) auf mesenchymale Stammzellen (MSZ) in 3D-HD-Ko-Kultur auf Ebene der ultrastrukturellen Histologie,

Immunmorphologie und Proteinexpression dargestellt werden. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass PCh in 3D-HD-Ko-Kultur mit MSZ sogar ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 in der Lage waren, MSZ zur chondrogenen Differenzierung anzuregen und das chondrogene Differenzierungspotenzial von MSZ zu verstärken.

Diese Schlussfolgerungen beruhen erstens auf elektronenmikroskopischen Ergebnissen, die die Formation von kartilaginären Gewebsstrukturen mit typischer chondrozytoider Morphologie in den Ko-Kulturen eindeutig nachweisen konnten. Zweitens konnte mittels Immunelektronenmikroskopie (IEM) die Synthese knorpeltypischer extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagen Typ II und Chondroitin-sulfatierte Proteoglykane (CSPG) in den Ko-Kulturen festgestellt werden. Drittens wies die Proteinexpression von chondrogenen extrazellulären Matrixkomponenten, Zellmembran- und Signaltransduktionsproteinen und des knorpelspezifischen Transkriptionsfaktors Sox-9 basierend auf ihrer Quantität und Qualität ebenfalls auf eine verstärkte chondrogene Differenzierung der mit PCh-ko-kultivierten MSZ-Kulturen hin.

Die TEM-Analyse verdeutlichte eine morphologische Änderung der MSZ in den Ko-Kulturen zu einem chondrogenen Phänotyp von rundlichen ovalen (Csaki et al., 2007; DeLise et al., 2000) teils paarweise gruppierten Zellen, die an Chondrone, die funktionelle Einheit des Knorpels, erinnern (Hunziker, E. B. et al., 2002). Diese neu differenzierten chondroblastären Zellen zeigten einen mit Euchromatin ausgefüllten Nukleus und stark entwickelte Zellorganellen wie Mitochondrien und rER, die auf verstärkte Proteinsynthese hindeuten. Die erhöhte Zytoaktivität spiegelte sich in der Produktion der mächtigen hoch organisierten EZM aus feinen dünnen Fibrillenbündeln wider, die den Interzellularraum ausfüllen. Teilweise waren die neu gebildeten kartilaginären Gewebsstrukturen, wie für Knorpelarchitektur typisch, umgeben von Schichten lang gestreckter abgeflachter fibroblastoider Zellen in der Peripherie eingebettet in einer EZM aus dicken Fibrillen, ähnlich dem Perichondrium *in vivo*. Diese ultrastrukturellen Merkmale der Zyto- und Gewebsarchitektur fanden sich ebenfalls in den Kontrollkulturen aus 100% PCh und sind charakteristisch für den hyalinen Knorpel (Hunziker, E. B. et al., 2002).

Neben den morphologischen Charakteristika konnten mittels IEM und Westernblot-Analyse die knorpeltypischen extrazellulären Matrixproteine Kollagen Typ II und CSPG, die im Wesentlichen für die speziellen biomechanischen Eigenschaften des Knorpelgewebes zuständig sind, in hoher Konzentration in den Ko-Kulturen nachgewiesen werden (Buckwalter et al., 1998; Burgeson et al., 1982; DeLise et al., 2000; Knudson et al., 2001; Poole et al., 2001). Physiologisch verleiht das dichte Fibrillennetzwerk vor allem aus Kollagen Typ II dem Knorpelgewebe Form und Struktur und sorgt für seine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber den Zug- und Scherkräften bei Gelenkbewegung, während CSPG etwa in Form von Aggrekan mit ihren langen hydratisierten Glykosaminoglykanketten durch Druckabsorption für die chondrale Kompressionsbeständigkeit verantwortlich sind (Buckwalter et al., 1998; Knudson et al., 2001; Naumann et al., 2002; Poole et al., 2001). Typ-II-Kollagenopathien führen zu schweren Chondrodysplasien wie z.B. Achondrogenese, Hypochondrogenese, kongenitale spondyloepiphysäre Dysplasie, Kniest-Dysplasie, Stickler-Arthroophthalmopathie und die mild- dominante Variante der Spondyloarthropathie (Spranger et al., 1994). Undifferenzierte mesenchymale Vorläuferzellen produzieren eine EZM, die reich an Kollagen Typ I, Tenascin, Hyaluronsäure und Fibronektin ist (DeLise et al., 2000; Dessau et al., 1980; Knudson et al., 1985; Kulyk et al., 1989; Linsenmayer et al., 1973; Mackie et al., 1987). Mit der präkartilaginären Kondensation und chondrogenen Differenzierung dieser Zellen einsetzend ändert sich die Komposition der EZM hin zu mehr knorpeltypischen Proteinen wie Kollagen Typ II, IX, XI, Gla-Protein, CSPG (Aggrekan) und Link-Protein (Barone et al., 1991; DeLise et al., 2000; Hall et al., 1995; Hascall et al., 1976; Kosher et al., 1986; Kulyk et al., 1991; Luo, G. et al., 1995; Stirpe et al., 1989; Swiderski et al., 1992), während die Synthese von Kollagen Typ I herunter reguliert wird (DeLise et al., 2000). Mehr noch spielen bestimmte EZM-Komponenten während der mesenchymalen Kondensation und Differenzierung eine bedeutende Rolle sowohl in der Regulation von Wachstumsfaktoren und Morphogenen durch Molekülpräsentation an ihre Zelloberflächenrezeptoren, so wie die TGF- β -Bindung an seine Rezeptoren über die EZM-Proteine Betaglykan und Endoglien vermittelt wird (Lopez-Casillas et al., 1994; Lopez-Casillas et al., 1993), als auch in der Transduktion von Signalen zwischen der Zelle und ihrer Umgebung (DeLise et al., 2000). So scheint Kollagen Typ II beispielsweise in der Lage zu sein, die chondrogene und osteogene Differenzierung von MSZ *in vitro* zu induzieren und positiv zu beeinflussen und gleichzeitig die Adipogenese der MSZ zu

unterdrücken (Bosnakovski et al., 2006; Chen, C. W. et al., 2005; Chiu et al., 2012). Bosnakovski et al. konnte deutlich zeigen (Bosnakovski et al., 2006), dass die Kultur von bovinen MSZ in 3D-Hydrogelen mit Kollagen Typ II in der extrazellulären Matrix zur gesteigerten Aktivierung von knorpeltypischen Genen wie *Sox9* (Bell et al., 1997; Sekiya et al., 2000), *Col2a1* (Augello et al., 2010; Bosnakovski et al., 2006), *Agc1* (Schwartz et al., 1999) und *COMP* (Deere et al., 2001) führte. Chen et al. konnte an lapinen und humanen mesenchymalen Progenitorzellen aus dem Knochenmark demonstrieren, dass Kollagen Typ II allein aber auch in Kombination mit Dexamethason und hTGF- β_1 im Medium eine deutlich erhöhte Glykosaminoglykan-Synthese (Shortkroff et al.) und mRNA-Expression von *Sox9*, Aggrekan und Typ-II Kollagen in diesen Zellen auslöst und somit induzierende und synergistische Effekte zusammen mit Dexamethason und TGF- β_1 auf die mesenchymale Chondrogenese ausübt (Chen, C. W. et al., 2005). Die in dieser Arbeit beobachtete Kollagen Typ II- und CSPG-Expression korreliert mit den erwähnten Untersuchungsergebnissen. Es ließ sich mittels IEM in allen MSZ/PCh-3D-Ko-Kulturen mit oder ohne Wachstumsfaktoren eine EZM reich an Kollagen Typ II und CSPG nachweisen, die mit der Struktur und Zusammensetzung der EZM in den Kontrollkulturen aus 100% PCh sehr ähnlich ist (Abb. 19, 20). Die Proteinkonzentrationen von Kollagen Typ II und CSPG in der Westerblot-Analyse zeigten einen dem Chondrozytenanteil in der Ko-Kultur entsprechenden Anstieg und erreichten in den 50/50-Ko-Kulturen die Höhe der Positivkulturen aus 100% PCh oder übertrafen sie (Abb. 21, 22). Hierbei konnte auch beobachtet werden, dass ein 10%iger Anteil von Chondrozyten in den unbehandelten Ko-Kulturen nur zu einer schwachen Proteinexpression von Kollagen Typ II und CSPG führte und offenbar noch nicht für eine potente Induktion der Chondrogenese reicht. Es könnte aber auch in diesem Fall nur den geringen Anteil von PCh und die von ihnen produzierten EZM-Komponenten in der Ko-Kultur repräsentieren (Abb. 21 B, Abb. 22 B). Alle übrigen Ergebnisse weisen auf eine verstärkte chondrogene Differenzierung von MSZ in Ko-Kultur mit Chondrozyten in 3D-HD-Massenkultur hin. Insbesondere in den unbehandelten 50/50-Ko-Kulturen konnte ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 eine ähnliche hohe Expression von Kollagen Typ II und CSPG festgestellt werden wie in den Kontrollkulturen aus 100% PCh, die nicht allein durch den Chondrozytenanteil in der Ko-Kultur erklärt werden kann (Abb. 21 D –E, J, Abb. 22 D –E, J). Aber auch in induzierten 70/30- und 50/50-Ko-Kulturen entsprach die Proteinexpression dem Niveau der positiven Chondrozytenkulturen oder übertraf es teilweise (Abb. 21 H – J, E, Abb. 22 H – J, E).

Diese Ergebnisse zeigen nicht nur die chondrogen induzierende Wirkung der ko-kultivierten PCh auf MSZ auf, sondern könnten gleichzeitig erklären, dass diese Effekte auf die modulierende Wirkung der von den PCh synthetisierten extrazellulären Matrixbestandteilen durch intensive Zell-Matrix-Interaktionen zurückzuführen sind. Es zeigte sich, wie in oben erwähnten Studien, dass Zell-Matrix-Interaktionen in 3D-HD-Massenkultur ausreichend zu sein scheinen, um MSZ zur chondrogenen Differenzierung anzuregen sowie die chondrogene Wirkung von Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 auf MSZ zu verstärken.

Neben dem Nachweis von knorpeltypischen EZM-Komponenten konnte in den Ko-Kulturen auch eine erhöhte Expression des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox-9 festgestellt werden (Akiyama et al., 2011; Augello et al., 2010; Bell et al., 1997). Sox-9 bindet nach Homodimerisierung infolge der Aktivierung mit seinen HMG-Box-Domänen an Enhancerregionen der DNA und aktiviert zusammen mit Sox-5 und Sox-6 die Transkription zahlreicher Gene für extrazelluläre Matrixkomponenten wie z.B. *Col2a1*, *Agc1*, *Col11a2*, *Col27.21*, *Cd-rap* und *Matrillin-1* (Akiyama et al., 2002; Akiyama et al., 2011; Bell et al., 1997; Bridgewater et al., 1998; Han et al., 2008; Huang et al., 2002; Jenkins et al., 2005; Kim, H. J. et al., 2011; Lefebvre et al., 1998; Rentsendorj et al., 2005; Sekiya et al., 2000; Xie et al., 1999). Mutationen im Sox9-Gen führen zum klinischen Bild der Campomelie-Dysplasie, eine schwere Chondrodysplasie mit Hypoplasie der meisten enchondralen Knochen und zusätzlichem Geschlechtsdysmorphismus (Chen, S. Y. et al., 2012; Huang et al., 2002). Akiyama et al. konnte zudem an Mäusen demonstrieren, dass Sox9-Inaktivierung nicht nur morphologisch zur Suppression der Knochen- und Knorpelbildung führt, sondern auch Blockaden im Differenzierungsweg der Chondrogenese auf molekulargenetischer Ebene verursacht, weshalb Sox-9 eine essentielle Rolle im Transkriptionsweg der chondrogenen Differenzierung zukommt (Akiyama et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression dieses für chondrogene Differenzierung und Proliferation essentiellen Transkriptionsfaktors mittels Westernblot-Analyse in allen untersuchten Ko-Kulturen unabhängig von Mischungsverhältnis und Differenzierungsmedium wie TGF- β_1 und Dexamethason nachgewiesen werden (Abb. 27). Dabei reicht offenbar ein relativ geringer Anteil an PCh (30%) aus, um die Expression von Sox-9 in der Ko-Kultur mit oder ohne Differenzierungsmedium auf ein ähnlich hohes Niveau zu steigern wie das der Kontrollkulturen aus 100% PCh, was für eine potente Induktion der Chondrogenese

durch den PCh-Anteil in der Ko-Kultur spricht (Abb. 27 C –E, H –J). Die geringe Konzentration von Sox-9 in den 90/10 Ko-Kulturen könnte zusammen mit der bereits erwähnten schwachen Kollagen Typ II- und CSPG-Expression entweder für eine beginnende chondrogene Differenzierung der MSZ sprechen oder aber nur den geringen PCh-Anteil in der Ko-Kultur widerspiegeln (Abb. 27 B, G). Interessanterweise war die Sox-9-Expression in den chondrogen induzierten 90/10-Ko-Kulturen deutlich niedriger als alle anderen Kulturen (Abb. 27 G). Dies könnte einerseits auf partiell antagonistische Wechselwirkungen zwischen Ko-Kultur und Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 auf die Chondrogenese von MSZ hinweisen. Andererseits würde die Tatsache, dass die Konzentration von extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen Typ II und CSPG in induzierten 90/10-Ko-Kulturen unwesentlich supprimiert war, eher dafür sprechen, dass auch hier von einer beginnenden chondrogenen Differenzierung der ko-kultivierten MSZ auszugehen ist und die niedrige Sox-9-Konzentration vermutlich das Prodromalstadium der Chondrogenese widerspiegelte. Eine geringfügig verstärkte Sox-9-Expression würde anscheinend bereits ausreichen, um eine adäquate Synthese knorpeltypischer EZM-Bestandteile zu gewährleisten.

Die hierbei beobachtete induzierende Wirkung der ko-kultivierten Chondrozyten auf MSZ könnte wie bereits postuliert über Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen vermittelt worden sein. Hierbei könnten Integrine als transmembranäres Glykoprotein bestehend aus einer α - und β -Untereinheit neben ihrer Funktion als Adhäsionsmolekül zwischen Zytoskelett und extrazellulärer Matrix (Kurtis et al., 2001; Tamkun et al., 1986) auch eine zentrale Rolle bei der Vermittlung und Übertragung von Signalreizen zwischen den verschiedenen Zellenpopulationen und ihrer Umgebung gespielt haben (Hynes, 1992, 2002; Loeser, 1997; Shakibaei et al., 1999). Auf Chondrozyten sind $\alpha 1\beta 1$ -, $\alpha 2\beta 1$ -, $\alpha 3\beta 1$ -, $\alpha 5\beta 1$ -, $\alpha 6\beta 1$ -, $\alpha 10\beta 1$ -, $\alpha v\beta 3$ - und $\alpha v\beta 5$ -Integrin exprimiert, wovon $\alpha 5\beta 1$ -Integrin als Fibronektinrezeptor und den $\alpha 1\beta 1$ -, $\alpha 2\beta 1$ - und $\alpha 10\beta 1$ -Integrinen als Kollagen-II-Rezeptor die größte Bedeutung bei Zell-Matrix-Interaktionen zukommt (Djouad et al., 2007; Egerbacher et al., 2003; Friedland et al., 2009; Goessler et al., 2005; Humphries et al., 2006; Loeser, 2002; Salter et al., 1992; Shakibaei et al., 2008; Woods et al., 1994). MSZ besitzen auf der Zelloberfläche mindestens $\alpha 1\beta 1$ -, $\alpha 2\beta 1$ -, $\alpha 3\beta 1$ -, $\alpha 4\beta 1$ -, $\alpha 5\beta 1$ -, $\alpha 6\beta 1$ -, $\alpha 7\beta 1$ -, $\alpha 11\beta 1$ -, $\alpha v\beta 3$ -, $\alpha 6\beta 4$ - und $\alpha v\beta 5$ -Integrin, die bei MSZ-Proliferation und –Differenzierung unterschiedlich stark exprimiert werden und somit verschiedene Zellverhalten, Zellfunktionen und Zell-Matrix-Interaktionen bei diesen Prozessen

reflektieren (Djouad et al., 2007; Goessler et al., 2009; Hynes, 2002; Majumdar et al., 2003). Die Integrin- vermittelte Übertragung der Zell-Matrix-Kommunikation geschieht durch, in ihrer häufigsten Form, Bindung des Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD)-Sequenz tragenden Liganden an die Nahtstelle der α - und β - Untereinheit des Integrins, wodurch das Protein eine Konformationsänderung erfährt und so extrazelluläre Signale auf intrazelluläre Adaptorproteine („outside-in“ signaling) wie z.B. Shc, Crk, Paxillin, Talin, p130^{Cas}, Vinculin, Caveolin und Fokaladhäsionskinase (FAK) sowie Tyrosinkinasen wie Pyk2, die mit G-Protein vermittelten Rezeptoren in Zusammenhang stehen, überträgt (Friedland et al., 2009; Giancotti, 2000; Howe et al., 1998; Humphries et al., 2006; Hynes, 2002; Loeser, 2002; Miyamoto et al., 1995; Shakibaei et al., 2008; Shakibaei et al., 1999). Diese intrazellulären Integrin-assoziierten Proteinkomplexe amplifizieren die Signale und leiten sie u.a. über das Adaptorprotein Src homology and collagen (Shc) an diverse weitere Transduktionswege einschließlich MAPKinase-Pathway weiter, der die zentrale Rolle in dieser Kaskade einnimmt und durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF κ B die Expression von Genen für vitale Zellfunktionen wie Zellmotilität, -Proliferation, -Überleben, -Differenzierung und Matrix-Remodeling reguliert (Li, J. et al., 2010; Loeser, 2002; Pearson et al., 2001; Seger et al., 1995; Stanton et al., 2003; Tuli et al., 2003; Wong et al., 2003). Frith et al. konnte beispielsweise an humanen MSZ durch simulierte Integrin-EZM-Kontakte zeigen, dass α 5-Integrin während der Osteogenese und α 6-Integrin während der Adipogenese verstärkt exprimiert werden (Frith et al., 2012). Goessler et al. konnte in mehreren Studien bei humanen MSZ aus dem Knochenmark, Fettgewebe und fetalem Nabelschnurblut feststellen, dass der Fibronektinrezeptor (α 5 β 1-Integrin), der Vitronektin/Osteopontin-Rezeptor (α v β 5-Integrin) und die Kollagenrezeptoren (α 1 β 1-, α 2 β 1-, α 3 β 1-Integrin) während der chondrogenen Differenzierung von MSZ deutlich hoch reguliert werden (Goessler et al., 2008; Goessler et al., 2009).

Das in dieser Arbeit beobachtete Integrinexpressionsmuster deckt sich zunächst mit bisherigen Ergebnissen und zeigt eine erhöhte Expression von β 1-Integrin in allen Ko-Kulturen, in den Kontrollkulturen aus PCh unabhängig von Induktion und in den mit Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1 inkubierten MSZ-Kulturen (Abb. 23). Daraus lässt sich schließen, dass in den unbehandelten Ko-Kulturen die ansteigende Integrinexpression entweder lediglich die proportional steigende PCh-Konzentration in der Ko-Kultur

reflektiert oder aber auch Ausdruck der Ko-Kultur-vermittelten beginnenden Chondrogenese von MSZ sein könnte (Abb. 23 B –D). In den induzierten Ko-Kulturen jedoch zeugt der sprunghafte Anstieg der Proteinkonzentration von erhöhter Signaltransduktionsaktivität von β_1 -Integrin und würde die Annahme bestätigen, dass Differenzierungssignale von ko-kultivierten PCh indirekt über Zell-Matrix-Kommunikation mittels Integrin an MSZ vermittelt werden, die zur deren chondrogenen Differenzierung führen (Abb. 23 G –I). Dies ist in den induzierten 70/30- und 50/50- Ko-Kulturen sehr deutlich zu sehen, da in diesen Kulturen die β_1 -Integrin-Expression besonders hoch ausfiel und der Proteinkonzentration von unbehandelten 100% PCh am nächsten kam (Abb. 23 H –I). So lassen sich synergistische Wirkungen von Ko-Kultur- und TGF- β -vermittelter chondrogenen Induktion von MSZ erkennen, die mit einer erhöhten Integrinexpression einhergeht. So konnten Ishibashi et al. kürzlich zeigen, dass TGF- β_1 zur erhöhten Synthese von $\alpha V\beta_1$ -Integrin in Chondrozyten aus Kaninchen führt und so zur verstärkten Adhäsion von Kollagen Typ II und anderen extrazellulären Matrixprotein an Chondrozyten beiträgt (Ishibashi et al., 2013). So konnten wir in dieser Arbeit ebenfalls zeigen, dass die β_1 -Integrin-Konzentration in den mit TGF- β_1 inkubierten 70/30- und 50/50- Ko-Kulturen trotz niedrigerem PCh-Anteil das gleiche Niveau wie unbehandelte 100% PCh erreichte oder es sogar übertraf (Abb. 23 H – I, E). Die β_1 -Integrin-Konzentration in den erwähnten Kulturen reflektiert somit nicht nur die intensive Zell-Matrix-Kommunikation, sondern zeigt auch ihre synergistische Rolle bei der TGF- β -vermittelten Differenzierung von MSZ auf. Auf diese Weise könnten Integrine wesentlich zur Vermittlung chondrogen induzierender Effekte von ko-kultivierten PCh über Zell-Matrix-Interaktionen und Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 auf MSZ beigetragen haben.

Die Integrin-assoziierte Signaltransduktion in die Zelle geschieht wie erwähnt u.a. über Tyrosin-Phosphorylierung des Adaptorproteins Shc (Src homology and collagen), das anschließend unter Bildung des Shc-Grb2-Sos-Komplexes den Ras/MAPKinase-Pathway aktiviert (Hynes, 2002; Ravichandran, 2001; Smith et al., 2006; Wary et al., 1996). Von den vier bekannten Shc-Proteinen ShcA (Hawley et al., 2011; Pelicci et al., 1992), ShcB (Kavanaugh et al., 1994; Pelicci et al., 1996), ShcC (Nakamura, T. et al., 1996; O'Bryan et al., 1996; Pelicci et al., 1996) und ShcD (Fagiani et al., 2007; Jones, N. et al., 2007) ist es vor allem das ubiquitär vorkommende ShcA mit seinen Isoformen 46, 52 und 66 kDa,

welches die Integrin-assoziierten Differenzierungssignale in Stammzellen moduliert, da die übrigen Shc-Proteine überwiegend in Neuronen und im ZNS zu finden sind (Hawley et al., 2011; Ravichandran, 2001). Es zeigt sich, dass hierbei die beiden ShcA-Isoformen 46 und 52 kDa eine Aktivierung des Erk1/2-Subpathways innerhalb der MAPK-Kaskaden bewirken, während die Isoform 66 kDa als Feedback-Inhibition die Erk-Aktivierung antagonisiert (Smith et al., 2006). Der MAPKinase-Pathway wiederum, der wie bereits erwähnt wichtige Zellfunktionen wie Embryogenese, Differenzierung, Zellproliferation und Zelltod beeinflusst (Pearson et al., 2001), steht im Zentrum der intrazellulären Signaltransduktionskaskade während der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Progenitorzellen (Stanton et al., 2003). Studien belegen, dass verschiedene Wachstumsfaktoren wie TGF- β , FGF und IGF-I ihre Chondrogenese induzierende Wirkung auf MSZ über die Aktivierung der MAPKinase-Kaskaden entfalten, die schließlich zur Hochregulation von Sox-9 führt (Li, J. et al., 2010; Longobardi et al., 2006; Murakami et al., 2000; Zhao et al., 2011). Hierbei ist es wichtig zu erwähnen, dass die MAPK-Kaskaden drei Subpathways besitzen, nämlich Erk1/2-, JNK1/2/3- und p38-MAPKinase, wovon die Erk- und p38-Kinasen im Wesentlichen an der Signaltransduktion der Chondrogenese beteiligt sind (Li, J. et al., 2010; Murakami et al., 2000; Pelaez et al., 2012; Stanton et al., 2003). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Inhibition der Chondrogenese durch EGF (Yoon et al., 2000) und Rapamycin (Oh, C. D. et al., 2001) stets mit einer heruntergesetzten p38-Aktivität einhergeht, was für eine zentrale Rolle von p38 in der Chondrogenese spricht (Nakamura, K. et al., 1999; Oh, C. D. et al., 2000). Die Funktion von Erk in diesem Prozess scheint komplexer zu sein und hängt sowohl von der Dauer und Intensität der stromaufwärts gelegenen Aktivierungspotentiale als auch vom Ort der Signale ab (Li, J. et al., 2010; Murakami et al., 2000; Stanton et al., 2003; Yoon et al., 2000). So konnte beispielsweise Murakami et al. erhöhte Sox-9-Expression unter FGF2-Wirkung in murinen Chondrozyten feststellen, die parallel mit erhöhter Erk1- und Erk2-Phosphorylierung einherging (Murakami et al., 2000). Hingegen wies Yoon et al. in mit EGF-behandelten gallinen MSZ nach, dass die Inhibition von EGF-induzierter Erk-Aktivierung durch den MEK1/2-Inhibitor PD98059 die Hemmung der Chondrogenese in diesen Zellen umkehrte, sodass die Inaktivierung von Erk offenbar einen essentiellen Schritt in der Induktion der Chondrogenese darstellt (Yoon et al., 2000).

In dieser Arbeit konnten wir feststellen, dass in MSZ/PCh-Ko-Kulturen in 3D-HD-Massenkultur mit oder ohne Differenzierungsmedium und in den chondrogen induzierten 3D-HD-MSZ-Kulturen der MAPKinase-Pathway über Aktivierung der Erk1/2-Kaskade an der *in vitro* Chondrogenese von MSZ beteiligt ist. Die Erk1/2-Aktivierung zeigte zudem ein konzentrationsabhängiges Expressionsmuster mit der geringsten Proteinkonzentration in den unbehandelten 90/10-MSZ/PCh-Ko-Kulturen und der höchsten in induzierten 50/50-Ko-Kulturen, die in Bezug auf die 42 kDa Einheit gar die der unbehandelten und induzierten PCh-Kulturen überstieg (Abb. 26). Dies könnte wie bereits erwähnt auf synergistische Effekte von MSZ/PCh-Ko-Kultur und TGF- β_1 auf die Chondrogenese von MSZ hindeuten, die sich hier in der erhöhten Aktivierung des Erk/MAPKinase-Pathway äußert. Dass die Höhe der Erk1/2-Expression in unbehandelten 70/30- und 50/50-Ko-Kulturen kaum von der der unbehandelten PCh unterschied, könnte zusammen mit der Sox-9-Expression in diesen Kulturen auf molekulargenetischer Ebene darauf hinweisen, dass MSZ durch ko-kultivierte PCh auch ohne Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 über Aktivierung von MAPKinase-Pathway und Sox-9 zur chondrogenen Differenzierung angeregt werden (Abb. 26 C – E, Abb. 27 C -E).

Des Weiteren deuten die hier gezeigten Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass in allen Kulturen außer den unbehandelten MSZ-Kulturen das Adaptorprotein Shc an der Integrin-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist. Auch hier zeigte sich in den unbehandelten 70/30- und 50/50-Ko-Kulturen, dass Shc hochreguliert war, wenn auch weniger stark wie in den Kontrollkulturen aus 100% PCh (Abb. 24). Das Expressionsmuster spräche somit ebenfalls für eine durch PCh-Ko-Kultur induzierte, über Zell-Matrix-Interaktion hervorgerufene Hochregulation der Integrin-Shc-Erk-Sox-9-Signaltransduktionskaskade ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 . Ein 10%iger Anteil von Chondrozyten an der Ko-Kultur hingegen führte nur zu einer leicht erhöhten Expression von Shc, was auf eine schwache chondrogene Induktion hinweist oder nur den PCh-Anteil in der Ko-Kultur widerspiegelt. Dass das Expressionsmuster von Shc vor allem in den induzierten 70/30- und 50/50- Ko-Kulturen von dem der übrigen Proteine etwas abwich, mag dem Umstand geschuldet sein, dass die Isoform 66 kDa des Proteins als inhibitorische Untereinheit ebenfalls aktiviert war und somit die intrinsische Feedback-Hemmung des Proteins regulierte. Ein alternativer Integrin-vermittelter Signaltransduktionsweg

parallel zur Shc-Aktivierung, der zur Hochregulation von Erk1/2- und Sox-9 führt, wäre aber ebenfalls denkbar und könnte die relativ erniedrigte Shc-Expression erklären. Daher wären weiterführende Studien zur Entschlüsselung der Integrin-vermittelten Signaltransduktion in der chondrogenen Differenzierung von MSZ von besonderem Interesse.

Basierend auf den gezeigten Untersuchungsergebnissen konnten wir in dieser Arbeit eine vom PCh-Anteil in der Ko-Kultur abhängige, über Zell-Matrix-Interaktion unter Aktivierung der MAPKinase-Kaskaden und Sox-9-Expression vermittelte Induktion der Chondrogenese von MSZ in 3D-HD-Massenkultur ohne Zusatz von chondrogenen Induktionsfaktoren wie TGF- β_1 und Dexamethason feststellen. Dabei reicht offenbar ein 30%iger Anteil an Chondrozyten in der Ko-Kultur aus, um die chondrogene Differenzierung der ko-kultivierten MSZ entscheidend zu beeinflussen. Der Stellenwert der Ko-Kultur mit 10% PCh in der *in vitro* Chondrogenese von MSZ scheint noch nicht hinreichend geklärt zu sein, sodass es sicherlich weiterer Studien bedarf, um die Aussagekraft der hier gezeigten Ergebnisse besser einordnen zu können.

5.4. Wechselwirkungen der Ko-Kultur aus MSZ und PCh und TGF- β_1 auf die Chondrogenese von MSZ in 3D-HD-Massenkultur

Zusätzlich zu den Wirkungen der MSZ/PCh-Ko-Kultur auf die Chondrogenese von MSZ in 3D-HD-Massenkultur wurden in dieser Arbeit auch die Wechselwirkungen zwischen der Ko-Kultur einerseits und chondrogen induzierenden Faktoren wie TGF- β_1 andererseits auf die chondrogene Differenzierung von MSZ untersucht. Wachstumsfaktoren aus der TGF- β -Superfamilie wie TGF- β_1 haben sich seit Jahrzehnten in einer Reihe von Tiermodellen als potente Induktionsfaktoren für die chondrogene Differenzierung von MSZ erwiesen (Bosnakovski et al., 2006; Johnstone et al., 1998; Leonard et al., 1991; Park et al., 2007; Seyedin et al., 1986; Xia et al., 2009; Zhao et al., 2011). Nach Bindung an seine beiden Rezeptoren TGF β -Rezeptor I und II mit intrinsischer Serin-Threonin-Kinaseaktivität entfaltet TGF- β seine intrazelluläre Wirkung über Phosphorylierung der TGF- β -Effektoren Smad2/Smad3 unter konsekutiver Komplexbildung mit Smad4. Dieser Smad-Komplex bindet nach Translokation in den Zellkern an bestimmte Sequenz spezifische Bindungsstellen wie

ATF2 (activating transcription factor-2) und SBE (Smad binding element) auf der DNA und interagiert so mit Enhancern für bestimmte Transkriptionsfaktoren für Zellproliferation, -Differenzierung und extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen $\alpha 1$, Kollagen $\alpha 2$, Typ-I-Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-I), Elastin und Perlekan (Massague, 1998; Zhao et al., 2011). Darüber hinaus steht TGF- $\beta 1$ sowohl über einen Smad-unabhängigen Signaltransduktionsweg (Hocavar et al., 1999; Yu et al., 2002) als auch über Smad2/3 mit dem MAPKinase-Pathway (MEK/Erk-Pathway) in Verbindung (Li, J. et al., 2010; Mulder, 2000), worauf seine Chondrogenese induzierenden Effekte auf molekularer Basis begründen könnten. Auch wir konnten in den durchgeführten Untersuchungen zunächst die positiv chondrogene Wirkung von TGF- $\beta 1$ in Kombination mit Dexamethason auf kanine MSZ in 3D-HD-Massenkultur verifizieren. Die Expression von knorpeltypischen Markern wie Kollagen Typ II, CSPG und Sox-9 sowie Zelladhäsions- und Signaltransduktionsmolekülen wie $\beta 1$ -Integrin, Shc und Erk1/2 war in den induzierten MSZ-3D-Massenkulturen hochreguliert und erreichte mit Ausnahme von Kollagen Typ II ähnlich hohe Werte wie in reinen Chondrozytenkulturen (Abb. 21 -27 F). Analog dazu ließ sich eine knorpeltypische Gewebsarchitektur mittels TEM mit dünnen, hoch strukturierten Fibrillenbündeln in der EZM der induzierten MSZ-Kulturen nachweisen (Abb. 18). Diese Aspekte deuten stark auf eine stattgefundene chondrogene Differenzierung der mit TGF- $\beta 1$ und Dexamethason inkubierten MSZ in 3D-HD-Massenkultur hin. Zusätzlich könnte auch das Mikromillieu der 3D-HD-Massenkultur, das die *in vivo* Bedingungen während der prächondrogenen Kondensationsphase der Skelettogenese imitiert (Toh et al., 2007; Zhang et al., 2010), durch intensive Zell-Zell-Kontakte die Wirkungen von TGF- $\beta 1$ und Dexamethason auf die Chondrogenese von MSZ verstärkt haben.

Die Wechselwirkungen von MSZ/PCh-Ko-Kultur und TGF- $\beta 1$ in Kombination mit Dexamethason auf die chondrogene Differenzierung von MSZ indes sind weniger eindeutig und unterliegen offensichtlich konzentrationsabhängigen Schwankungen. Auffällig war es beispielsweise, dass die Proteinkonzentration von intrazellulären Signaltransduktionsmolekülen wie Shc, Erk1/2 und Sox-9 in den mit TGF- $\beta 1$ und Dexamethason chondrogen induzierten 3D-90/10-MSZ/PCh-Ko-Kulturen durchweg deutlich niedriger ausfiel als in den induzierten 100% MSZ-Kulturen ohne PCh-Beimischung und in allen anderen induzierten Kulturen, während dieselben Proteine in den induzierten 70/30- und 50/50-Ko-Kulturen wieder das gleiche

Expressionsniveau erreichten wie in den 100%igen PCh-Kulturen (Abb. 24 - 26 F-J). Andererseits war diese Diskrepanz in Bezug auf knorpelspezifische extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen Typ II und CSPG sowie β 1-Integrin zwischen den oben genannten Kulturen nicht so deutlich feststellbar (Abb. 21- 23). Zudem konnte durch die TEM- und IEM-Analysen in den chondrogen induzierten 90/10-MSZ/PCh-Ko-Kulturen eine kartilaginäre Histologie mit runden bis ovalen chondrozytoiden Zellen eingebettet in einer EZM aus Typ-II-Kollagen und CSPG nachgewiesen werden, was eher für eine ebenfalls positive Chondrogenese in den besagten Kulturen sprechen würde (Abb. 18 C, 19 ,20). Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf partiell antagonistische Wechselwirkungen zwischen den Effekten der Ko-Kultur und denen von TGF- β ₁ und Dexamethason auf die chondrogene Differenzierung von MSZ hindeuten, wobei der PCh-Gehalt an der Ko-Kultur eine bedeutende Rolle spielt. In geringer Konzentration (10%) scheint die Chondrozytenpopulation in der Ko-Kultur inhibierende Effekte auf TGF- β ₁ auszuüben, wodurch die chondrogene Differenzierung der ko-kultivierten MSZ nicht mit Sicherheit angenommen werden kann. Mit steigender PCh-Konzentration in der Ko-Kultur (30%) scheinen sich jedoch synergistische Effekte von 3D-Ko-Kultur einerseits und TGF- β ₁ und Dexamethason andererseits zu entfalten, wodurch die Chondrogenese von MSZ positiv beeinflusst wird. In den induzierten 50/50-Ko-Kulturen waren die sich verstärkenden Effekte von 3D-Ko-Kultur und TGF- β ₁ mit Dexamethason am augenfälligsten, da die Expressionswerte aller untersuchten Proteine ähnlich hoch lagen wie die der 100%igen PCh-Kulturen oder diese teilweise sogar übertrafen (Abb. 21 - 26 I - J). Die Produktion von Kollagen Typ II und CSPG ließ sich eindeutig mittels IEM in der EZM der induzierten 50/50-Ko-Kulturen nachweisen (Abb. 19 -20). Ebenso konnte in der TEM-Analyse deutliche Formation von Knorpelknötchen mit Chondron-ähnlicher Morphologie in den induzierten 50/50-Ko-Kulturen festgestellt werden, wie es dem elektronenmikroskopischen Bild des hyalinen Knorpels entspricht (Abb. 18 A, E). Vorstellbar wäre, dass diese Beobachtungen auf die intrazellulären molekularen Wechselwirkungen zwischen TGF- β -Smad-vermittelter Genexpression und Zell-Matrix-Integrin-assoziiierter MAPKinase-Kaskaden zurückzuführen sind. In niedriger Konzentration von PCh in der Ko-Kultur könnte die durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen hervorgerufene Integrin-vermittelte Signaltransduktion mit MAPKinase-Aktivierung die Wirkungen von TGF- β /Smad-Komplex aktivierter Genexpression partiell antagonisieren bzw. überwiegen, weswegen in unseren Untersuchungen die Proteinkonzentrationen von Shc, Erk1/2 und Sox-9 dem geringen

Chondrozytenanteil in der Ko-Kultur entsprechend relativ schwach ausfielen. Mit zunehmendem PCh-Gehalt scheinen sich die Effekte des Integrin- und TGF- β /Smad-Pathways zu amplifizieren, so dass sich beide Signaltransduktionswege synergistisch auf die MAPKinase-Aktivierung auswirken, die schließlich mit einer verstärkten Sox-9-Hochregulation und vermehrten Produktion knorpeltypischer EZM-Proteine einhergeht.

Die hier postulierten Erklärungen für die Wechselwirkungen zwischen Ko-Kultur und TGF- β_1 auf die Chondrogenese von MSZ in 3D-HD-Massenkultur stellen vor dem Hintergrund der gezeigten widersprüchlichen Ergebnisse nur einen Versuch dar, die beobachteten Vorgänge sinnvoll einzuordnen. Gewiss sind noch weiterführende Studien notwendig, um die komplexen wechselseitigen Regulationsmechanismen von MSZ/PCh-Ko-Kultur und Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 auf die chondrogene Differenzierung von MSZ *in vitro* weiter zu beleuchten.

5.5. Hypertrophie und terminale Differenzierung in der Chondrogenese von MSZ und MSZ/PCh-Ko-Kulturen in 3D-HD-Massenkultur

Um einen möglichst umfassenden Einblick in die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen zu gewinnen, wurden in dieser Arbeit alle 3D-HD-Massenkulturen auf Zeichen der Hypertrophie der Chondrogenese hin untersucht. Während der physiologischen Skelettogenese werden aus mesenchymalen Progenitorzellen durch Kondensation zunächst Chondroprogenitorzellen, die im Laufe der Chondrogenese sich weiter zu Chondroblasten und Chondrozyten differenzieren (Goldring, 2012; Goldring et al., 2007; Goldring et al., 2006; Hall et al., 1995). Die neu differenzierten Chondrozyten verbleiben entweder in einem definierten Ruhestadium, um die Struktur und Funktion des Knorpelgewebes aufrechtzuerhalten oder sie durchlaufen weitere Proliferationsprozesse, die zur terminalen Differenzierung, Hypertrophie und Apoptose der Chondrozyten mit Kalzifizierung und Vaskularisation des Knorpels führen und letztlich in die enchondrale Ossifikation münden mit Umwandlung des hypertrophen Knorpels in Knochengewebe (Goldring, 2012; Mackie et al., 2008; Olsen et al., 2000; Wuelling et al., 2010). Damit einhergehend ändert sich ebenso die Zusammensetzung der EZM des Knorpels mit vermindertem Anteil von Kollagen Typ II bei gleichzeitig vermehrtem Nachweis von Kollagen Typ X (Mwale et al., 2000; Pelttari et al., 2006), das

aufgrund seines spezifischen Vorkommens im hypertrophen Knorpel und seiner Kalziumbindungsfähigkeit als der sensitivste Marker des hypertrophen ossifizierenden Knorpels gilt (Beier et al., 1999a; Goldring, 2012; Kielty et al., 1985; Kirsch et al., 1991; Pelttari et al., 2006; Reichenberger et al., 1991). Bei Untersuchungen der *in vitro* Chondrogenese von MSZ wurde abermals der Prozess der terminalen Differenzierung und Hypertrophie in chondrogen induzierten MSZ-Kulturen beobachtet (Johnstone et al., 1998; Mueller et al., 2008; Mwale et al., 2006; Pelttari et al., 2006; Reichenberger et al., 1991). Johnstone et al. wies in mesenchymalen Progenitorzellen aus dem Knochenmark von Kaninchen nach 21-tägiger chondrogener Induktion erhöhte Proteinexpression von Kollagen Typ X nach und zeigte so, dass mesenchymale Progenitorzellen unter gängigen Differenzierungsbedingungen sich zu hypertrophen Chondrozyten enddifferenzieren werden (Johnstone et al., 1998). Pelttari et al. stellte bei humanen MSZ aus dem Knochenmark gar fest, dass in den chondrogen induzierten MSZ-3D-Pelletkulturen bereits nach 7 Tagen Kollagen Typ X nachweisbar war, dessen Konzentration bis zum Tag 21 stetig zunahm, wohingegen humane Chondrozyten unter gleichen Kulturbedingungen kein Kollagen Typ X exprimierten (Pelttari et al., 2006). Darüber hinaus beobachteten sie, dass in den induzierten MSZ-Kulturen die Proteinexpression von Kollagen Typ X die von Kollagen Typ II zeitlich vorausging (Pelttari et al., 2006). Auf der anderen Seite stellte Fischer et al. in ihrer Untersuchung fest, dass humane Chondrozyten aus dem Gelenk (Quarto et al.) in der Lage sind, durch Ko-Kultur mit mesenchymalen Stammzellen (MSZ) aus dem Knochenmark die Hypertrophieeigung dieser chondrogen differenzierten MSZ zu unterdrücken und gar die Kalzifizierung der HAC/MSZ Mischpellets *in vivo* in SCID-Mäusern zu verhindern (Fischer, J. et al., 2010).

In diesem Zusammenhang konnten wir in unseren Untersuchungen mit kaninem Zellmaterial ebenfalls erhöhte Proteinexpression von Kollagen Typ X in den mit TGF- β_1 und Dexamethason chondrogen induzierten 3D-MSZ-Kulturen und allen PCh- und MSZ/PCh-Ko-Kulturen in 3D-HD-Massenkultur mit oder ohne Induktion nach 21 Tagen feststellen (Abb. 27). Daraus lässt sich ableiten, dass in Kongruenz mit anderen Studien auch chondrogen induzierte kanine MSZ in 3D-HD-Massenkultur ihren durch die Induktion eingeschlagenen Differenzierungsweg nicht aufrechterhalten können und dazu tendieren sich weiter zu Chondrozyten mit hypertrophem Phänotyp zu differenzieren. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass anders als die Beobachtung von

Pelttari et al. (Pelttari et al., 2006) zumindest kanine Chondrozyten nach 21 Tagen *in vitro* Kultivierung ebenfalls Kollagen Typ X exprimieren und somit zur Hypertrophie neigen (Abb. 27 E, J). Ferner deutet der Nachweis von Kollagen Typ X in allen Ko-Kulturen mit oder ohne Induktion darauf hin, dass anders als in der Studie von Fischer et al. (Fischer, J. et al., 2010) eine Unterdrückung der chondrogenen Hypertrophie von MSZ in unserem Modell nicht reproduziert werden konnte (Abb. 27 B-D, G-I). Mehr noch könnte die Korrelation zwischen proportional zunehmender Proteinkonzentration von Kollagen Typ X zum steigenden PCh-Anteil in der Ko-Kultur in den unbehandelten Ko-Kulturen darauf hinweisen, dass der Stimulus zur Produktion von Kollagen Typ X eventuell sogar von den Chondrozyten in der Ko-Kultur ausgeht (Abb. 27 B-D). Obwohl ko-kultivierte PCh wie in obigen Ausführungen erwähnt MSZ zur chondrogenen Differenzierung zu induzieren vermögen, scheinen sie unter 3D-HD-Massenkultur-Bedingung nicht in der Lage zu sein, ihre eigene chondrogene Stabilität und die der chondrogen induzierten MSZ aufrechtzuerhalten.

Schließlich scheinen die wechselseitigen Einflüsse der 3D-HD-Ko-Kultur und TGF- β 1 auf die Hypertrophieeigung und terminale Differenzierung von chondrogen differenzierten MSZ komplexer zu sein als angenommen. Einerseits wird bei der chondrogenen Induktion von MSZ mittels TGF- β häufig eine Ko-Expression von Kollagen Typ X zur Kollagen-Typ-II- Synthese beobachtet (Pelttari et al., 2006; Weiss et al., 2010), was auf eine Hypertrophie induzierende Wirkung von TGF- β verweist (Mueller et al., 2010). Andererseits existiert ebenso eine Vielzahl an Studien, die TGF- β eine supprimierende Wirkung auf die Hypertrophie und terminale Differenzierung von Chondrozyten *in vitro* zuschreiben (Ballock et al., 1993; Bohme et al., 1995; Kato et al., 1988; Tschan et al., 1993). Unsere Ergebnisse würden eher die Position von Pelttari et al., Weiss et al. und Mueller et al. unterstützen, da in unseren Untersuchungen in den mit TGF- β 1 induzierten MSZ-, PCh- und MSZ/PCh-Ko-Kulturen in 3D-HD-Massenkultur sowohl Kollagen Typ II als auch Kollagen Typ X mittels Westernblot nachgewiesen werden konnten (Abb. 21, 27). Da zudem in den unbehandelten Ko-Kulturen und den PCh-Reinkulturen ebenfalls Kollagen Typ X feststellbar war und ihre Expression in den entsprechenden Kulturen unter TGF- β 1-Behandlung nicht zurückging, konnte deshalb in dieser Arbeit zumindest für TGF- β 1 eine Hypertrophie inhibierende Wirkung auf Chondrozyten und chondrogen induzierte MSZ nicht nachgewiesen werden. Vielmehr wäre es durchaus denkbar, dass sie unter dem TGF- β -Einfluss verstärkt zu hypertrophen Chondrozyten proliferieren.

Tatsächlich konnte Narcisi et al. kürzlich zeigen, dass TGF- β_1 humane Chondrozyten *in vitro* zum hypertrophen Phänotyp induziert und die Vaskularisierung dieser anschließend implantierten Knorpel-Neokonstrukte im Mausmodell begünstigt (Narcisi et al., 2012). Beier et al. konnte zudem nachweisen, dass die Raf/MEK/ERK- und p38-MAPK-Pathways in die Aktivierung des Kollagen-X- Promoters involviert sind (Beier et al., 1999a). Da wie oben postuliert 3D-Ko-Kultur und TGF- β_1 ebenfalls über die Aktivierung der MAPKinase-Kaskaden (Erk1/2- und p38-MAPK-Pathway) MSZ zur chondrogenen Differenzierung induzieren, tragen sie vermutlich über denselben Signaltransduktionsweg auch zur Hypertrophie und terminalen Differenzierung der PCh und chondrogen induzierten MSZ bei. So konnte Zhen et al. in einer Arbeit zur Wirkung des Parathormons (PTH) auf galline Chondrozyten nachweisen, dass die Inhibition von p38-MAPK-Kaskade durch Parathormon (PTH), SB303580 oder beides zusammen zu einer Herunterregulierung der mRNA-Expression von Kollagen Typ X führte (Zhen et al., 2001), was auf eine stimulierende Rolle vom p38-MAPK-Pathway in der Hypertrophie und terminalen Transdifferenzierung von Chondrozyten zu Osteoblasten *in vitro* hinweist. Ebenso konnte Reilly et al. demonstrieren, dass Erk1/2-Inhibition zur Steigerung der Promoteraktivität von Kollagen Typ X in gallinen Chondrozyten unter BMP-2-Kultivierung beitrug, während p38-Inhibition mit einer verminderten Kollagen-Typ-X-Promoteraktivität einherging (Reilly et al., 2005). Diese Beobachtungen sprechen für eine antagonistische Rolle zwischen Erk1/2- und p38-MAPK-Pathway in der Regulierung der Hypertrophie von Chondrozyten, wobei Erk1/2- eine hemmende und p38-MAPK eine stimulierende Rolle spielt (Beier et al., 1999a; Reilly et al., 2005; Stanton et al., 2003). Im Widerspruch zu diesen Befunden konnte Prasadam et al. jedoch in einer Ko-Kultur-Studie mit Chondrozyten und Osteoblasten aus osteoarthrotischen Patienten feststellen, dass eine Heraufregulierung von Erk1/2-Phosphorylierung und eine Herunterregulierung von p38-Phosphorylierung zu hypertrophen Veränderungen mit erhöhter mRNA-Expression von *CBFA1*, *COL10* und *ALP* in humanen Chondrozyten führten (Prasadam et al., 2010). Dies hätte eine konträre Schlussfolgerung zur Folge, wobei Erk1/2-Aktivierung eine induzierende und p38-Phosphorylierung eine hemmende Wirkung auf die hypertrophe Differenzierung von Chondrozyten ausübt (Beier et al., 1999b; Prasadam et al., 2010). Wir konnten in unseren Untersuchungen die Beobachtung von Prasadam et al. bestätigen und ebenfalls feststellen, dass in kaninen Chondrozyten, chondrogen induzierten MSZ und MSZ/PCh-Ko-Kulturen mit oder ohne Induktion nach 21 Tagen die Proteinexpression von Kollagen Typ X und Erk1/2

gleichzeitig heraufreguliert war, was auf eine Hypertrophie induzierende Rolle vom Erk1/2-MAPK-Pathway in kaninen Chondrozyten und in der chondrogenen Differenzierung von kaninen MSZ in 3D-Hd-Massenkultur hinweist. Die hier teils widersprüchlichen Beobachtungen könnten sowohl auf die unterschiedlichen Untersuchungsspezies (gallin, human und kanin) mit ihren verschiedenen intrinsischen Zellverhalten zurückzuführen sein als auch durch die Applikation unterschiedlicher Wachstumsfaktoren und Hormone (PTH, BMP-2, TGF- β_3 und TGF- β_1) sowie uneinheitliche Kulturbedingungen (Monolayer, High-Density Micromass-Kultur und 3D-HD-Massenkultur) bedingt sein. Deshalb wären zusätzliche Untersuchungen mit vergleichbaren Zellmaterial und Kulturbedingungen zum besseren Verständnis über die Regulationsmechanismen in der terminalen Differenzierung und Hypertrophie der *in vitro* Chondrogenese von MSZ von besonderem Interesse. Darüber hinaus wären Studien zur Hemmung der Hypertrophie und terminalen Differenzierung von Chondrozyten und chondrogen differenzierten MSZ zur Kultivierung stabiler Knorpel-Neokonstrukte *in vitro* von größter klinischer Relevanz. Studien mit PTH, PTHrP und bFGF zur Unterdrückung der chondrogenen Hypertrophie, Apoptose und Ossifikation lieferten bereits vielversprechende Erkenntnisse in dieser Hinsicht (Henderson et al., 1995; Serra et al., 1999; Weiss et al., 2010; Zhen et al., 2001).

5.6. Einfluss der Zell-Zell-Interaktion zwischen MSZ und PCh auf die chondrogene Differenzierung von MSZ in 3D-HD-Massenkultur

Wie in obigen Ausführungen erwähnt konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass Chondrozyten in 3D-HD-Massenkultur morphogenetische Effekte auf ko-kultivierte MSZ ausüben, die zur Induktion der Chondrogenese in den MSZ führen. Diese konzentrationsabhängigen chondrogenen Wirkungen könnten wie postuliert auf intensiven Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beruhen. Durch TEM, IEM und Integrinexpressionsmuster konnten in den Ko-Kulturen bereits ausgeprägte Zell-Matrix-Kontakte nachgewiesen und deren Rolle bei der Vermittlung chondrogener Differenzierungssignale an MSZ verdeutlicht werden.

Um die induzierenden Wirkungen von PCh auf MSZ in Ko-Kultur auf zellulärer Ebene eingehender zu untersuchen, wurde zusätzlich im Rahmen dieser Arbeit mittels

PKH-Membranfärbung das Verhalten von MSZ und PCh in Monolayer-Ko-Kultur beobachtet und analysiert. Hierbei konnten wie bereits angenommen intensive und breitflächige Zell-Zell-Kontakte zwischen beiden Zelltypen über den gesamten Zeitraum hinweg mikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 29 - 32). Teilweise nahmen sie über lang gestreckte Pseudopodien aktiv Verbindung zueinander auf (Abb. 29 - 32). Deutliche Mitosefiguren deuten auf erhöhten zellulären Metabolismus hin und spiegeln die Vitalität der Zellen wider (Abb. 29 C, 30 A, C, 31 A, B,). Zudem kann ein aktiver Stoffaustausch angenommen werden, da Vesikel ähnliche Partikel oder Membranabschnürungen sowohl von MSZ als auch PCh abgegeben und vom anderen Zelltyp aufgenommen wurden oder sich auf deren Zellmembran befanden (Abb. 30 B, 31 B, C, 32 B, C). Auch der Nachweis zweifarbiger Zellen weist auf aktive Stoffaustauschvorgänge hin (Abb. 31 A). Die Präsenz von rot markierten MSZ mit rundlich-ovaler typisch chondrozytärer Morphologie könnte gar als beginnende chondrogene Differenzierung von MSZ interpretiert werden (Abb. 32 A). Im anschließenden Endozytose-Exozytose-Assay wurden die beobachteten Austauschvorgänge von löslichen Faktoren zwischen MSZ und PCh eingehender untersucht. Der Nachweis von Gold-konjugierten Sekundärantikörpern unterschiedlicher Größe (5nm und 10nm) innerhalb derselben Zelle trotz vorheriger getrennter Prä-Inkubation belegt anschaulich, dass tatsächlich lösliche Stoffe über das Kulturmedium und zelluläre Kontakte zwischen beiden Zellpopulationen per Exozytose und Endozytose ausgetauscht wurden (Abb. 35). Diese zellulären Prozesse und zytomorphologischen Merkmale lassen den Schluss zu, dass Zell-Zell-Interaktionen zwischen MSZ und PCh in Form von intensiven interzellulären Kontakten, aktiver Kommunikation über Pseudopodien und vesikulärem Stoffaustausch mittels Endo- und Exozytose wesentlich zur Induktion der Chondrogenese von MSZ in Ko-Kultur mit PCh in 3D-HD-Massenkultur beigetragen haben.

Dass morphogenetische Signale von ko-kultivierten Binde- und Stützgewebszellen die Differenzierung von MSZ induzieren und regulieren, wurde bereits in zahlreichen Arbeiten gezeigt (Acharya et al., 2012; Kii et al., 2004; Kim, H. et al., 2003; Richardson et al., 2006). So konnte z.B. Richardson et al. in Monolayer-Ko-Kulturstudien aus adulten humanen MSZ und Chondrozyten aus dem Nucleus pulposus (NP) beobachten, dass zellulärer Kontakt zwischen beiden Zelltypen zur Hochregulation chondrozytärer NP-Markergene in MSZ führte (Richardson et al., 2006). Acharya et al. unterstrich ebenfalls

die Bedeutung von zellulären Interaktionen zwischen humanen MSZ und Chondrozyten in Ko-Kultur für die verstärkte Chondro-Induktion von MSZ in diesem Kultursystem (Acharya et al., 2012). Kii et al. identifizierte in diesem Kontext Cadherin-11 als wichtige Zelladhäsionsrezeptoren, die durch Vermittlung der Zell-Zell-Interaktion die chondrogene und osteogene Differenzierung von MSZ direkt regulieren (Kii et al., 2004). Andererseits existiert auch eine Reihe von Studien, die darauf hinweisen, dass Zell-Zell-Kontakt alleine nicht ausreicht, um Chondrogenese in MSZ auszulösen, sondern vielmehr die Sekretion löslicher Faktoren von Chondrozyten wie TGF- β_1 , IGF-1, BMP-2 und PTHrP die chondrogene Differenzierung von MSZ maßgeblich beeinflusst (Ahmed et al., 2007; Fischer, J. et al., 2010; Hwang et al., 2007; Liu et al., 2010). Unsere Ergebnisse unterstützen beide Positionen und verdeutlichen die Notwendigkeit von sowohl Zell-Zell-Kontakt wie im PKH-Monolayer-Versuch gezeigt als auch dem Austausch von löslichen Faktoren wie mithilfe des Endo- und Exozytose-Assays verdeutlicht, um die chondrogene Differenzierung von MSZ *in vitro* zu induzieren. Die Diskrepanz zwischen den oben genannten Studienergebnissen könnte sowohl den unterschiedlichen Kulturbedingungen mit oder ohne Wachstumsfaktoren als auch den verschiedenen Untersuchungsspezies (human, equin, porcin, murin und bovin) geschuldet sein (Ahmed et al., 2007; Fischer, J. et al., 2010; Hwang et al., 2007; Lettry et al., 2010; Meretoja et al., 2012; Miao et al., 2011; Richardson et al., 2006; Tang et al., 2012), weswegen ein direkter Vergleich der Ergebnisse miteinander nur bedingt zulässig sei. Weiterführende Studien mit einheitlichem Zellmaterial und standardisierten Kulturbedingungen zwecks besserer Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse könnten neue Erkenntnisse in die wechselseitigen Einflussmöglichkeiten und –Mechanismen zwischen MSZ und PCh liefern und dazu beitragen, deren Bedeutung für die *in vitro* und *in vivo* Chondrogenese von MSZ besser zu verstehen.

5.7. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels histologischer und immunhistochemischer Nachweismethoden festgestellt werden, dass kanine mesenchymale Stammzellen (kMSZ) aus dem Knochenmark einzig durch die Ko-Kultur mit kaninen primären Chondrozyten (kPCh) in 3D-HD-Massenkultur auch ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 zur Chondrogenese induziert werden können. Wichtige

Marker der Chondrogenese wie extrazelluläre Matrixproteine Kollagen Typ II und CSPG sowie der Transkriptionsfaktor der Chondrogenese Sox-9 konnten in den unbehandelten MSZ/PCh-Ko-Kulturen nachgewiesen werden, deren Proteinkonzentration über dem Mischungsverhältnis der PCh in den Ko-Kulturen lag. Dabei scheinen 30% primäre Chondrozyten an der Ko-Kultur zu genügen, um eine potente Induktion der Chondrogenese in den ko-kultivierten mesenchymalen Stammzellen auszulösen. Die Aussagekraft über das chondrogene Induktionspotenzial von 10% PCh in der Ko-Kultur ist angesichts der Diskrepanz der Ergebnisse zwischen Elektronenmikroskopie und Proteinexpression noch limitiert und bedarf weitergehender Untersuchungen. Es konnte mittels Westernblot-Analyse, PKH-Monolayer-Ko-Kultur und Endozytose-Exozytose-Assay veranschaulicht werden, dass zelluläre Mechanismen wie Zell-Matrix-Interaktion, interzelluläre Kommunikation über Zell-Zell-Kontakt und Pseudopodien sowie der aktive Austausch von vesikulären und löslichen Faktoren per Medium wesentlich zur chondrogenen Induktion von MSZ beigetragen haben. Hierbei scheint die Aktivierung des MAPKinase-Pathways durch Zell-Zell- und Zell-Matrix vermittelte Integrin-Shc-Erk-Kaskade mit konsekutiver Hochregulation von Sox-9 und Chondrogenese-assoziiierter Gene wie *Col2a1*, *Agc1*, *Col11a2*, *Col27.21*, *Cd-rap* und *Matrillin-1* eine wesentliche Rolle bei der Chondrogenese von MSZ in 3D-HD-Ko-Kultur gespielt zu haben.

In Bezug auf die Wechselwirkung von Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 und MSZ/PCh-Ko-Kultur auf die chondrogene Differenzierung von MSZ konnte anhand der Ergebnisse in dieser Arbeit noch keine eindeutige Aussage getroffen werden. Es scheint eine von der Konzentration der PCh in der Ko-Kultur abhängige Korrelation in der chondrogen induzierenden Wirkung zwischen MSZ/PCh-Ko-Kultur in 3D-HD-Massenkultur und TGF- β_1 zu bestehen mit möglicherweise antagonistischer Wechselwirkung bei 10% PCh in der Ko-Kultur und TGF- β_1 . Ab einem Chondrozytenanteil von 30% konnte im Zusammenspiel mit TGF- β_1 eine verstärkende Chondrogenese in den induzierten Ko-Kulturen festgestellt werden, sodass hierfür amplifizierende Induktionswirkungen von MSZ/PCh-Ko-Kultur und Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 auf die chondrogene Differenzierung von MSZ in 3D-HD-Massenkultur angenommen werden können. Abschließend konnte zudem gezeigt werden, dass die inhärente Hypertrophieeigung von Chondrozyten als auch chondrogen differenzierten MSZ auch durch die Ko-Kultur in 3D-HD-Massenkultur nicht adäquat inhibiert werden

konnte, sodass es angesichts dieser Herausforderungen und Limitationen sicherlich noch weiterer *in vitro* und *in vivo* Studien bedarf, um MSZ effektiv, praktikabel und verlässlich zur Behandlung osteochondrotischer Schäden in klinischer Routine einsetzen zu können.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Knorpeldefekte stellen aufgrund ihrer intrinsisch limitierten Regenerationsfähigkeit *in vivo* und mit einer Prävalenz von ca. 60% in arthroskopischen Untersuchungen ein häufiges und erhebliches klinisches Problem dar (Chiang et al., 2009; Widuchowski et al., 2007). Derzeitige Standardtherapien wie Autografts und markraumeröffnende Verfahren (MEV) indes können aufgrund bisher bescheidener Ergebnisse und entscheidender Einschränkungen noch nicht alle Patienten mit osteochondrotischen Schäden adäquat versorgen (Madry et al., 2011; Schindler, 2011). Neuere Ansätze durch Tissue Engineering von Knorpel-Neokonstrukten bessere therapeutische Resultate zu erzielen, nutzen in der Regel autologe Chondrozyten und Wachstumsfaktoren wie im Fall der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) (Madry et al., 2008). Da die biopsiebedingte Entnahme gesunden Knorpels ein zusätzliches Trauma für das Gelenk darstellt und die entnommenen Chondrozyten *in vitro* zu Dedifferenzierung und Hypertrophie mit Verlust der chondrogenen Eigenschaften neigen, wäre eine alternative Zellpopulation mit chondrogenem Differenzierungspotenzial wünschenswert, um größere Knorpeldefekte adäquat zu behandeln (Peterson et al., 2010; Schulze-Tanzil et al., 2004).

Vor diesem Hintergrund bieten mesenchymale Stammzellen (MSZ) eine solche Option, weil sie multipotent und *in vitro* kultivierbar sind und mit geringem Aufwand aus beispielsweise Knochenmark oder Fettgewebe isoliert werden können (Caplan, 1991; Pittenger et al., 1999; Uccelli et al., 2008). Während das Verständnis für die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen kontinuierlich zunimmt (Csaki et al., 2007; Johnson et al., 2012; Pelttari et al., 2008), wurde bisher nur wenig Anstrengung unternommen MSZ und Chondrozyten im 3D-High-Density-Ko-Kultur-Modell über einen längeren Zeitraum zu beobachten, um so interzelluläre Wechselwirkungen zwischen beiden Zellpopulationen und deren Auswirkung auf die Stammzelldifferenzierung detailliert zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, Effekte der Ko-Kultur von mesenchymalen Stammzellen (MSZ) und primären Chondrozyten (PCh) sowohl in einem dreidimensionalen High-Density-Massenkulturmodell (3D-HD-MK) in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit oder ohne Induktionsfaktoren wie TGF- β_1 und

Dexamethason als auch in Monolayer-Kultur auf die chondrogene Differenzierung von MSZ eingehender zu analysieren, um so neue Einblicke in und Erkenntnisse über die komplexen und multifaktoriellen Prozesse von Stammzelldifferenzierung zu gewinnen.

Im ersten Schritt der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die isolierten Zellen aus kaninem Knochenmark allen Kriterien zur Charakterisierung multipotenter mesenchymaler Stammzellen (MSZ) gerecht werden konnten und sich in 3D-HD-Massenkultur mit entsprechendem Differenzierungsmedium zu Zellen mit chondrozytären Eigenschaften differenzieren ließen. Im nächsten Schritt wurden die MSZ mit kaninen primären Chondrozyten (kPCh) in 3D-HD-Massenkultur in verschiedenen Mischungsverhältnissen (90/10-, 70/30- und 50/50-MSZ/PCh) ohne oder mit Differenzierungsmedium einschließlich TGF- β_1 und Dexamethason und 1:1 in Monolayer-Kultur ko-kultiviert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Chondrogenese von MSZ durch Ko-Kultivierung mit PCh in 3D-HD-Massenkultur auch ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren wie TGF- β_1 erreicht werden kann. Es genügen bereits 30% Chondrozyten an der Ko-Kultur, um MSZ zur Differenzierung in einen chondrozytären Phänotyp zu verleiten mit vergleichbaren Charakteristika und Eigenschaften der 100%igen primären Chondrozyten. Neben dem Nachweis knorpeltypischer Zytomorphologie und Gewebsarchitektur durch Transmissionselektronenmikroskopie konnten knorpelspezifische extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen Typ II und CSPG mittels Immunelektronenmikroskopie in allen Ko-Kulturen festgestellt werden. Ebenso konnte mittels Western-Blot-Analyse ein knorpeltypisches Proteinexpressionsmuster einschließlich des Transkriptionsfaktors der Chondrogenese Sox-9 in den Ko-Kulturen mit mindestens 30%igem Chondrozytenanteil nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten diese Effekte in den unbehandelten MSZ-Kulturen nicht festgestellt werden.

Die hier beobachtete chondrogene Induktion der MSZ in 3D-HD-Ko-Kultur mit PCh wurde einerseits indirekt durch Zell-Matrix-Interaktionen vermittelt und andererseits durch aktive Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellpopulationen über Pseudopodienbildung, enge Zell-Zell-Kontakte und Austausch von Vesikeln hervorgerufen, wie sie in den PKH-gefärbten Monolayer-Ko-Kulturen deutlich erkennbar war. Darüber hinaus scheint der Austausch von Vesikeln bzw. löslichen Faktoren über das Nährmedium eine ebenso entscheidende Rolle bei der

Chondrogenese von MSZ in 3D-HD-Ko-Kultur gespielt zu haben. Der elektronenmikroskopische Nachweis unterschiedlich großer Gold-konjugierter Antikörper innerhalb derselben Zelle trotz vorheriger separater Inkubation im Endozytose-Exozytose-Assay untermauert diese These zusätzlich. Die Aussagekraft über das Induktionspotenzial von 10% PCh in der Ko-Kultur an der *in vitro* Chondrogenese von MSZ ist angesichts der inkonsistenten Ergebnisse in dieser Arbeit noch limitiert und bedarf weiterer klärender Studien. Hinzu kommt, dass die inhärente Hypertrophieeigung von chondrogen differenzierten MSZ und Chondrozyten *in vivo* und *in vitro* auch durch die Ko-Kultur beider Zelltypen in 3D-HD-Massenkultur mit oder ohne Induktionsfaktoren nicht adäquat inhibiert werden kann, sodass sicherlich noch erhebliche Herausforderungen bestehen für die klinische Applikation von MSZ zu Knorpelrekonstruktion und -ersatz.

Die hier beobachteten Effekte der Ko-Kultur von mesenchymalen Stammzellen (MSZ) und primären Chondrozyten (PCh) auf die *in vitro* Chondrogenese von MSZ liefern wichtige Erkenntnisse für die Weiterentwicklung des Tissue Engineering von Knorpel-Neokonstrukten und könnten Anwendung in zukünftigen Bemühungen finden, Knorpeldefekte effizienter zu versorgen als dies mit den heutigen Methoden möglich ist.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Acharya, C., Adesida, A., Zajac, P., Mumme, M., Riesle, J., Martin, I., & Barbero, A. (2012). Enhanced chondrocyte proliferation and mesenchymal stromal cells chondrogenesis in coculture pellets mediate improved cartilage formation. *J Cell Physiol*, 227(1), 88-97.
- Ahmed, N., Dreier, R., Gopferich, A., Grifka, J., & Grassel, S. (2007). Soluble signalling factors derived from differentiated cartilage tissue affect chondrogenic differentiation of rat adult marrow stromal cells. *Cell Physiol Biochem*, 20(5), 665-678.
- Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., & de Crombrughe, B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*, 16(21), 2813-2828.
- Akiyama, H., & Lefebvre, V. (2011). Unraveling the transcriptional regulatory machinery in chondrogenesis. *J Bone Miner Metab*, 29(4), 390-395.
- Anderson, C. C., Cook, J. L., Kreeger, J. M., Tomlinson, J. L., & Wagner-Mann, C. C. (1999). In vitro effects of glucosamine and acetylsalicylate on canine chondrocytes in three-dimensional culture. *Am J Vet Res*, 60(12), 1546-1551.
- Augello, A., & De Bari, C. (2010). The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Hum Gene Ther*, 21(10), 1226-1238.
- Ballock, R. T., Heydemann, A., Wakefield, L. M., Flanders, K. C., Roberts, A. B., & Sporn, M. B. (1993). TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Dev Biol*, 158(2), 414-429.
- Barone, L. M., Owen, T. A., Tassinari, M. S., Bortell, R., Stein, G. S., & Lian, J. B. (1991). Developmental expression and hormonal regulation of the rat matrix Gla protein (MGP) gene in chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem*, 46(4), 351-365.
- Beier, F., & LuValle, P. (1999a). Serum induction of the collagen X promoter requires the Raf/MEK/ERK and p38 pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 262(1), 50-54.
- Beier, F., Taylor, A. C., & LuValle, P. (1999b). Raf signaling stimulates and represses the human collagen X promoter through distinguishable elements. *J Cell Biochem*, 72(4), 549-557.
- Bell, D. M., Leung, K. K., Wheatley, S. C., Ng, L. J., Zhou, S., Ling, K. W., Sham, M. H., Koopman, P., Tam, P. P., & Cheah, K. S. (1997). SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet*, 16(2), 174-178.
- Benya, P. D., & Shaffer, J. D. (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30(1), 215-224.
- Bercovici, N., Givan, A. L., Waugh, M. G., Fisher, J. L., Vernel-Pauillac, F., Ernststoff, M. S., Abastado, J. P., & Wallace, P. K. (2003). Multiparameter precursor analysis of T-cell responses to antigen. *J Immunol Methods*, 276(1-2), 5-17.
- Bian, L., Zhai, D. Y., Mauck, R. L., & Burdick, J. A. (2011). Coculture of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes reduces hypertrophy and enhances functional properties of engineered cartilage. *Tissue Eng Part A*, 17(7-8), 1137-1145.
- Birmingham, E., Niebur, G. L., McHugh, P. E., Shaw, G., Barry, F. P., & McNamara, L. M. (2012). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by

- osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater*, 23, 13-27.
- Bohme, K., Winterhalter, K. H., & Bruckner, P. (1995). Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor-beta 2 and basic fibroblast growth factor in synergy. *Exp Cell Res*, 216(1), 191-198.
- Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, G., Ishiguro, T., Okumura, M., Iwanaga, T., Kadosawa, T., & Fujinaga, T. (2004). Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Exp Hematol*, 32(5), 502-509.
- Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, G., Takagi, S., Okumura, M., & Fujinaga, T. (2006). Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnol Bioeng*, 93(6), 1152-1163.
- Boutonnat, J., Barbier, M., Muirhead, K., Mousseau, M., Grunwald, D., Ronot, X., & Seigneurin, D. (2000). Response of chemosensitive and chemoresistant leukemic cell lines to drug therapy: simultaneous assessment of proliferation, apoptosis, and necrosis. *Cytometry*, 42(1), 50-60.
- Boutonnat, J., Muirhead, K. A., Barbier, M., Mousseau, M., Ronot, X., & Seigneurin, D. (1998). PKH26 probe in the study of the proliferation of chemoresistant leukemic sublines. *Anticancer Res*, 18(6A), 4243-4251.
- Breinan, H. A., Minas, T., Hsu, H. P., Nehrer, S., Shortkroff, S., & Spector, M. (2001). Autologous chondrocyte implantation in a canine model: change in composition of reparative tissue with time. *J Orthop Res*, 19(3), 482-492.
- Breinan, H. A., Minas, T., Hsu, H. P., Nehrer, S., Sledge, C. B., & Spector, M. (1997). Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg Am*, 79(10), 1439-1451.
- Bridgewater, L. C., Lefebvre, V., & de Crombrughe, B. (1998). Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J Biol Chem*, 273(24), 14998-15006.
- Buckwalter, J. A., & Mankin, H. J. (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*, 47, 477-486.
- Burgeson, R. E., Hebda, P. A., Morris, N. P., & Hollister, D. W. (1982). Human cartilage collagens. Comparison of cartilage collagens with human type V collagen. *J Biol Chem*, 257(13), 7852-7856.
- Cao, L., Yang, F., Liu, G., Yu, D., Li, H., Fan, Q., Gan, Y., Tang, T., & Dai, K. (2011). The promotion of cartilage defect repair using adenovirus mediated Sox9 gene transfer of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 32(16), 3910-3920.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5), 641-650.
- Caplan, A. I. (2000). Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. *Tissue Eng*, 6(1), 1-8.
- Caplan, A. I. (2005). Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng*, 11(7-8), 1198-1211.
- Caplan, A. I., & Goldberg, V. M. (1999). Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop Relat Res*(367 Suppl), S12-16.
- Centeno, C. J., Busse, D., Kisiday, J., Keohan, C., Freeman, M., & Karli, D. (2008). Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician*, 11(3), 343-353.
- Chawla, K., Klein, T. J., Schumacher, B. L., Schmidt, T. A., Voegtline, M. S., Thonar, E. J., Masuda, K., & Sah, R. L. (2006). Tracking chondrocytes and assessing their

- proliferation with PKH26: effects on secretion of proteoglycan 4 (PRG4). *J Orthop Res*, 24(7), 1499-1508.
- Chen, C. W., Tsai, Y. H., Deng, W. P., Shih, S. N., Fang, C. L., Burch, J. G., Chen, W. H., & Lai, W. F. (2005). Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. *J Orthop Res*, 23(2), 446-453.
- Chen, S. Y., Lin, S. J., Tsai, L. P., & Chou, Y. Y. (2012). Sex-reversed acampomelic campomelic dysplasia with a homozygous deletion mutation in SOX9 gene. *Urology*, 79(4), 908-911.
- Chen, W. C., Yao, C. L., Wei, Y. H., & Chu, I. M. (2011). Evaluating osteochondral defect repair potential of autologous rabbit bone marrow cells on type II collagen scaffold. *Cytotechnology*, 63(1), 13-23.
- Chen, W. H., Lai, M. T., Wu, A. T., Wu, C. C., Gelovani, J. G., Lin, C. T., Hung, S. C., Chiu, W. T., & Deng, W. P. (2009). In vitro stage-specific chondrogenesis of mesenchymal stem cells committed to chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 60(2), 450-459.
- Cheng, T., Maddox, N. C., Wong, A. W., Rahnama, R., & Kuo, A. C. (2012). Comparison of gene expression patterns in articular cartilage and dedifferentiated articular chondrocytes. *J Orthop Res*, 30(2), 234-245.
- Chiang, H., & Jiang, C. C. (2009). Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *J Formos Med Assoc*, 108(2), 87-101.
- Chiu, L. H., Yeh, T. S., Huang, H. M., Leu, S. J., Yang, C. B., & Tsai, Y. H. (2012). Diverse effects of type II collagen on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*, 227(6), 2412-2420.
- Chu, C. R., Szczodry, M., & Bruno, S. (2010). Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev*, 16(1), 105-115.
- Conget, P. A., & Minguell, J. J. (1999). Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*, 181(1), 67-73.
- Cook, S. D., Patron, L. P., Salkeld, S. L., & Rueger, D. C. (2003). Repair of articular cartilage defects with osteogenic protein-1 (BMP-7) in dogs. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 3, 116-123.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P. N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badyrak, S., Buhring, H. J., Giacobino, J. P., Lazzari, L., Huard, J., & Peault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), 301-313.
- Csaki, C., Matis, U., Mobasheri, A., & Shakibaei, M. (2009). Co-culture of canine mesenchymal stem cells with primary bone-derived osteoblasts promotes osteogenic differentiation. *Histochem Cell Biol*, 131(2), 251-266.
- Csaki, C., Matis, U., Mobasheri, A., Ye, H., & Shakibaei, M. (2007). Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol*, 128(6), 507-520.
- Cucchiaroni, M., Ekici, M., Schetting, S., Kohn, D., & Madry, H. (2011). Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Eng Part A*, 17(15-16), 1921-1933.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 119(Pt 11), 2204-2213.
- Davatchi, F., Abdollahi, B. S., Mohyeddin, M., Shahram, F., & Nikbin, B. (2011). Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int J Rheum Dis*, 14(2), 211-215.

- de Crombrughe, B., Lefebvre, V., Behringer, R. R., Bi, W., Murakami, S., & Huang, W. (2000). Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol*, 19(5), 389-394.
- Deere, M., Rhoades Hall, C., Gunning, K. B., LeFebvre, V., Ridall, A. L., & Hecht, J. T. (2001). Analysis of the promoter region of human cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *Matrix Biol*, 19(8), 783-792.
- DeLise, A. M., Fischer, L., & Tuan, R. S. (2000). Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*, 8(5), 309-334.
- Denker, A. E., Haas, A. R., Nicoll, S. B., & Tuan, R. S. (1999). Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation*, 64(2), 67-76.
- Dessau, W., von der Mark, H., von der Mark, K., & Fischer, S. (1980). Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *J Embryol Exp Morphol*, 57, 51-60.
- Djouad, F., Delorme, B., Maurice, M., Bony, C., Apparailly, F., Louis-Pence, P., Canovas, F., Charbord, P., Noel, D., & Jorgensen, C. (2007). Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 9(2), R33.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Dorshkind, K. (1990). Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol*, 8, 111-137.
- Ducy, P. (2000). Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn*, 219(4), 461-471.
- Egerbacher, M., & Haeusler, G. (2003). Integrins in growth plate cartilage. *Pediatr Endocrinol Rev*, 1(1), 2-8.
- Emadedin, M., Aghdami, N., Taghiyar, L., Fazeli, R., Moghadasali, R., Jahangir, S., Farjad, R., & Baghaban Eslaminejad, M. (2012). Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. *Arch Iran Med*, 15(7), 422-428.
- Enerback, S. (2009). The origins of brown adipose tissue. *N Engl J Med*, 360(19), 2021-2023.
- Fagiani, E., Giardina, G., Luzi, L., Cesaroni, M., Quarto, M., Capra, M., Germano, G., Bono, M., Capillo, M., Pelicci, P., & Lanfranccone, L. (2007). RaLP, a new member of the Src homology and collagen family, regulates cell migration and tumor growth of metastatic melanomas. *Cancer Res*, 67(7), 3064-3073.
- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A. M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J. C., Deeb, S., Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, M. R., Staels, B., Vidal, H., & Auwerx, J. (1997). The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*, 272(30), 18779-18789.
- Filardo, G., Madry, H., Jelic, M., Roffi, A., Cucchiarini, M., & Kon, E. (2013a). Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 21(8), 1717-1729.
- Filardo, G., Madry, H., Jelic, M., Roffi, A., Cucchiarini, M., & Kon, E. (2013b). Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*.

- Fischer, J., Dickhut, A., Rickert, M., & Richter, W. (2010). Human articular chondrocytes secrete parathyroid hormone-related protein and inhibit hypertrophy of mesenchymal stem cells in coculture during chondrogenesis. *Arthritis Rheum*, 62(9), 2696-2706.
- Fischer, K., Andreesen, R., & Mackensen, A. (2002). An improved flow cytometric assay for the determination of cytotoxic T lymphocyte activity. *J Immunol Methods*, 259(1-2), 159-169.
- Friedland, J. C., Lee, M. H., & Boettiger, D. (2009). Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science*, 323(5914), 642-644.
- Frith, J. E., Mills, R. J., Hudson, J. E., & Cooper-White, J. J. (2012). Tailored integrin-extracellular matrix interactions to direct human mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells Dev*, 21(13), 2442-2456.
- Giancotti, F. G. (2000). Complexity and specificity of integrin signalling. *Nat Cell Biol*, 2(1), E13-14.
- Giannini, S., Buda, R., Cavallo, M., Ruffilli, A., Cenacchi, A., Cavallo, C., & Vannini, F. (2010). Cartilage repair evolution in post-traumatic osteochondral lesions of the talus: from open field autologous chondrocyte to bone-marrow-derived cells transplantation. *Injury*, 41(11), 1196-1203.
- Giovannini, S., Diaz-Romero, J., Aigner, T., Heini, P., Mainil-Varlet, P., & Nesic, D. (2010). Micromass co-culture of human articular chondrocytes and human bone marrow mesenchymal stem cells to investigate stable neocartilage tissue formation in vitro. *Eur Cell Mater*, 20, 245-259.
- Givan, A. L. (2007). A flow cytometric assay for quantitation of rare antigen-specific T cells: using cell-tracking dyes to calculate precursor frequencies for proliferation. *Immunol Invest*, 36(5-6), 563-580.
- Givan, A. L., Fisher, J. L., Waugh, M., Ernstoff, M. S., & Wallace, P. K. (1999). A flow cytometric method to estimate the precursor frequencies of cells proliferating in response to specific antigens. *J Immunol Methods*, 230(1-2), 99-112.
- Goessler, U. R., Bugert, P., Bieback, K., Huber, K., Fleischer, L. I., Hormann, K., & Riedel, F. (2005). Differential modulation of integrin expression in chondrocytes during expansion for tissue engineering. *In Vivo*, 19(3), 501-507.
- Goessler, U. R., Bugert, P., Bieback, K., Stern-Straeter, J., Bran, G., Hormann, K., & Riedel, F. (2008). Integrin expression in stem cells from bone marrow and adipose tissue during chondrogenic differentiation. *Int J Mol Med*, 21(3), 271-279.
- Goessler, U. R., Bugert, P., Bieback, K., Stern-Straeter, J., Bran, G., Sadick, H., Hormann, K., & Riedel, F. (2009). In vitro analysis of integrin expression in stem cells from bone marrow and cord blood during chondrogenic differentiation. *J Cell Mol Med*, 13(6), 1175-1184.
- Goldring, M. B. (2012). Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 4(4), 269-285.
- Goldring, M. B., & Goldring, S. R. (2007). Osteoarthritis. *J Cell Physiol*, 213(3), 626-634.
- Goldring, M. B., Tsuchimochi, K., & Ijiri, K. (2006). The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem*, 97(1), 33-44.
- Grande, D. A., Mason, J., Light, E., & Dines, D. (2003). Stem cells as platforms for delivery of genes to enhance cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 2, 111-116.
- Grigoriadis, A. E., Heersche, J. N., & Aubin, J. E. (1996). Analysis of chondroprogenitor frequency and cartilage differentiation in a novel family of clonal chondrogenic rat cell lines. *Differentiation*, 60(5), 299-307.

- Gu, Y., Wang, Y., Dai, H., Lu, L., Cheng, Y., & Zhu, W. (2012). Chondrogenic differentiation of canine myoblasts induced by cartilage-derived morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 in vitro. *Mol Med Report*, 5(3), 767-772.
- Haas, A. R., & Tuan, R. S. (1999). Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function. *Differentiation*, 64(2), 77-89.
- Haleem, A. M., Singergy, A. A., Sabry, D., Atta, H. M., Rashed, L. A., Chu, C. R., El Shewy, M. T., Azzam, A., & Abdel Aziz, M. T. (2010). The Clinical Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results. *Cartilage*, 1(4), 253-261.
- Hall, B. K., & Miyake, T. (1995). Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol*, 39(6), 881-893.
- Hall, B. K., & Miyake, T. (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*, 22(2), 138-147.
- Han, Y., & Lefebvre, V. (2008). L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol Cell Biol*, 28(16), 4999-5013.
- Harris, J. D., Siston, R. A., Brophy, R. H., Lattermann, C., Carey, J. L., & Flanigan, D. C. (2011). Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation--a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*, 19(7), 779-791.
- Hascall, V. C., Oegema, T. R., & Brown, M. (1976). Isolation and characterization of proteoglycans from chick limb bud chondrocytes grown in vitro. *J Biol Chem*, 251(11), 3511-3519.
- Hawley, S. P., Wills, M. K., Rabalski, A. J., Bendall, A. J., & Jones, N. (2011). Expression patterns of ShcD and Shc family adaptor proteins during mouse embryonic development. *Dev Dyn*, 240(1), 221-231.
- Hegewald, A. A., Ringe, J., Bartel, J., Kruger, I., Notter, M., Barnewitz, D., Kaps, C., & Sittinger, M. (2004). Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. *Tissue Cell*, 36(6), 431-438.
- Henderson, J. E., Amizuka, N., Warshawsky, H., Biasotto, D., Lanske, B. M., Goltzman, D., & Karaplis, A. C. (1995). Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol Cell Biol*, 15(8), 4064-4075.
- Hjelle, K., Solheim, E., Strand, T., Muri, R., & Brittberg, M. (2002). Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy*, 18(7), 730-734.
- Hocevar, B. A., Brown, T. L., & Howe, P. H. (1999). TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *Embo J*, 18(5), 1345-1356.
- Hofmann, S., Knecht, S., Langer, R., Kaplan, D. L., Vunjak-Novakovic, G., Merkle, H. P., & Meinel, L. (2006). Cartilage-like tissue engineering using silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*, 12(10), 2729-2738.
- Hong, R., Choi, D. Y., Do, N. Y., & Lim, S. C. (2008). Fine-needle aspiration cytology of a lipoblastoma: a case report. *Diagn Cytopathol*, 36(7), 508-511.
- Horan, P. K., Melnicoff, M. J., Jensen, B. D., & Slezak, S. E. (1990). Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking. *Methods Cell Biol*, 33, 469-490.
- Horan, P. K., & Slezak, S. E. (1989). Stable cell membrane labelling. *Nature*, 340(6229), 167-168.

- Howe, A., Aplin, A. E., Alahari, S. K., & Juliano, R. L. (1998). Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol*, 10(2), 220-231.
- Hu, A. Y., Tseng, Y. F., Weng, T. C., Liao, C. C., Wu, J., Chou, A. H., Chao, H. J., Gu, A., Chen, J., Lin, S. C., Hsiao, C. H., Wu, S. C., & Chong, P. (2011). Production of inactivated influenza H5N1 vaccines from MDCK cells in serum-free medium. *PLoS One*, 6(1), e14578.
- Huang, W., Lu, N., Eberspaecher, H., & De Crombrughe, B. (2002). A new long form of c-Maf cooperates with Sox9 to activate the type II collagen gene. *J Biol Chem*, 277(52), 50668-50675.
- Huber, M., Trattnig, S., & Lintner, F. (2000). Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol*, 35(10), 573-580.
- Humphries, J. D., Byron, A., & Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, 119(Pt 19), 3901-3903.
- Hunter, W. (1995). Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. *Clin Orthop Relat Res*(317), 3-6.
- Hunziker, E. (2002). Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, 10(6), 432-463. doi: 10.1053/joca.2002.0801
- Hunziker, E. B., Quinn, T. M., & Hauselmann, H. J. (2002). Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 10(7), 564-572.
- Hwang, N. S., Varghese, S., Puleo, C., Zhang, Z., & Elisseeff, J. (2007). Morphogenetic signals from chondrocytes promote chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*, 212(2), 281-284.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1), 11-25.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673-687.
- Ishibashi, H., Nariai, Y., Kanno, T., Onimaru, M., & Sekine, J. (2013). Effects of transforming growth factor beta 1 on the plasminogen activation system, collagen and integrin synthesis, and proliferation of rabbit mandibular condylar chondrocytes. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. doi: 10.1016/j.ijom.2013.10.010
- Jenkins, E., Moss, J. B., Pace, J. M., & Bridgewater, L. C. (2005). The new collagen gene COL27A1 contains SOX9-responsive enhancer elements. *Matrix Biol*, 24(3), 177-184.
- Johnson, K., Zhu, S., Tremblay, M. S., Payette, J. N., Wang, J., Bouchez, L. C., Meeusen, S., Althage, A., Cho, C. Y., Wu, X., & Schultz, P. G. (2012). A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science*, 336(6082), 717-721.
- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., & Yoo, J. U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*, 238(1), 265-272.
- Johnstone, B., & Yoo, J. (1999). Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clinical orthopaedics and related research*(367 Suppl), 62.
- Jones, D. L., & Wagers, A. J. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 11-21.
- Jones, N., Hardy, W. R., Friese, M. B., Jorgensen, C., Smith, M. J., Woody, N. M., Burden, S. J., & Pawson, T. (2007). Analysis of a Shc family adaptor protein, ShcD/Shc4, that associates with muscle-specific kinase. *Mol Cell Biol*, 27(13), 4759-4773.

- Jung, M., Kaszap, B., Redohl, A., Steck, E., Breusch, S., Richter, W., & Gotterbarm, T. (2009). Enhanced early tissue regeneration after matrix-assisted autologous mesenchymal stem cell transplantation in full thickness chondral defects in a minipig model. *Cell Transplant*, 18(8), 923-932.
- Kadiyala, S., Young, R. G., Thiede, M. A., & Bruder, S. P. (1997). Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*, 6(2), 125-134.
- Kaoutzanis, M., Yokota, M., Sibia, R., & Peterson, J. W. (1993). Neurologic evaluation in a canine model of single and double subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Methods*, 50(3), 301-307.
- Kasemkijwattana, C., Hongeng, S., Kesprayura, S., Rungsinaporn, V., Chaipinyo, K., & Chansiri, K. (2011). Autologous bone marrow mesenchymal stem cells implantation for cartilage defects: two cases report. *J Med Assoc Thai*, 94(3), 395-400.
- Katagiri, T., & Takahashi, N. (2002). Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*, 8(3), 147-159.
- Kato, Y., Iwamoto, M., Koike, T., Suzuki, F., & Takano, Y. (1988). Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: regulation by transforming growth factor beta and serum factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(24), 9552-9556.
- Kaufman, B. R., Fox, P. L., & Graham, L. M. (1992). Platelet-derived growth factor production by canine aortic grafts seeded with endothelial cells. *J Vasc Surg*, 15(4), 699-706; discussion 706-697.
- Kavanaugh, W. M., & Williams, L. T. (1994). An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science*, 266(5192), 1862-1865.
- Kempf, V. A., Bohn, E., Noll, A., Bielfeldt, C., & Autenrieth, I. B. (1998). In vivo tracking and protective properties of Yersinia-specific intestinal T cells. *Clin Exp Immunol*, 113(3), 429-437.
- Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J., & Yang, B. B. (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell Res*, 12(1), 19-32.
- Kielty, C. M., Kwan, A. P., Holmes, D. F., Schor, S. L., & Grant, M. E. (1985). Type X collagen, a product of hypertrophic chondrocytes. *Biochem J*, 227(2), 545-554.
- Kii, I., Amizuka, N., Shimomura, J., Saga, Y., & Kudo, A. (2004). Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lineage. *J Bone Miner Res*, 19(11), 1840-1849.
- Kim, H., Lee, J. H., & Suh, H. (2003). Interaction of mesenchymal stem cells and osteoblasts for in vitro osteogenesis. *Yonsei Med J*, 44(2), 187-197.
- Kim, H. J., & Im, G. I. (2009). Chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: greater doses of growth factor are necessary. *J Orthop Res*, 27(5), 612-619.
- Kim, H. J., & Im, G. I. (2011). Electroporation-mediated transfer of SOX trio genes (SOX-5, SOX-6, and SOX-9) to enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 20(12), 2103-2114.
- Kirsch, T., & von der Mark, K. (1991). Ca²⁺ binding properties of type X collagen. *FEBS Lett*, 294(1-2), 149-152.
- Knudson, C. B., & Knudson, W. (2001). Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol*, 12(2), 69-78.
- Knudson, C. B., & Toole, B. P. (1985). Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. *Dev Biol*, 112(2), 308-318.

- Kosher, R. A., Kulyk, W. M., & Gay, S. W. (1986). Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J Cell Biol*, 102(4), 1151-1156.
- Kuettner, K. E. (1992). Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem*, 25(3), 155-163.
- Kuhn, N. Z., & Tuan, R. S. (2010). Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol*, 222(2), 268-277.
- Kulyk, W. M., Coelho, C. N., & Kosher, R. A. (1991). Type IX collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *Matrix*, 11(4), 282-288.
- Kulyk, W. M., Franklin, J. L., & Hoffman, L. M. (2000). Sox9 expression during chondrogenesis in micromass cultures of embryonic limb mesenchyme. *Exp Cell Res*, 255(2), 327-332.
- Kulyk, W. M., Upholt, W. B., & Kosher, R. A. (1989). Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation. *Development*, 106(3), 449-455.
- Kurtis, M. S., Tu, B. P., Gaya, O. A., Mollenhauer, J., Knudson, W., Loeser, R. F., Knudson, C. B., & Sah, R. L. (2001). Mechanisms of chondrocyte adhesion to cartilage: role of beta1-integrins, CD44, and annexin V. *J Orthop Res*, 19(6), 1122-1130.
- Ladd, A. C., Pyatt, R., Gothot, A., Rice, S., McMahon, J., Traycoff, C. M., & Srour, E. F. (1997). Orderly process of sequential cytokine stimulation is required for activation and maximal proliferation of primitive human bone marrow CD34+ hematopoietic progenitor cells residing in G0. *Blood*, 90(2), 658-668.
- Langer, R. (2000). Tissue engineering. *Mol Ther*, 1(1), 12-15.
- Lanzkron, S. M., Collector, M. I., & Sharkis, S. J. (1999). Hematopoietic stem cell tracking in vivo: a comparison of short-term and long-term repopulating cells. *Blood*, 93(6), 1916-1921.
- Lee, E. H., & Hui, J. H. (2006). The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br*, 88(7), 841-851.
- Lee, H. J., Yu, C., Chansakul, T., Varghese, S., Hwang, N. S., & Elisseeff, J. H. (2008). Enhanced chondrogenic differentiation of embryonic stem cells by coculture with hepatic cells. *Stem Cells Dev*, 17(3), 555-563.
- Lee, J. W., Kim, Y. H., Kim, S. H., Han, S. H., & Hahn, S. B. (2004). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med J*, 45 Suppl, 41-47.
- Lefebvre, V., & de Crombrughe, B. (1998). Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biol*, 16(9), 529-540.
- Lehner, T., Mitchell, E., Bergmeier, L., Singh, M., Spallek, R., Cranage, M., Hall, G., Dennis, M., Villinger, F., & Wang, Y. (2000). The role of gamma delta T cells in generating antiviral factors and beta-chemokines in protection against mucosal simian immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol*, 30(8), 2245-2256.
- Leonard, C. M., Fuld, H. M., Frenz, D. A., Downie, S. A., Massague, J., & Newman, S. A. (1991). Role of transforming growth factor-beta in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF-beta and evidence for endogenous TGF-beta-like activity. *Dev Biol*, 145(1), 99-109.
- Lettry, V., Hosoya, K., Takagi, S., & Okumura, M. (2010). Coculture of equine mesenchymal stem cells and mature equine articular chondrocytes results in improved chondrogenic differentiation of the stem cells. *Jpn J Vet Res*, 58(1), 5-15.
- Li, J., Zhao, Z., Liu, J., Huang, N., Long, D., Wang, J., Li, X., & Liu, Y. (2010). MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells

- through delicate interaction with TGF-beta1/Smads pathway. *Cell Prolif*, 43(4), 333-343.
- Li, L., & Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 605-631.
- Li, Z., Kupcsik, L., Yao, S. J., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2009). Chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells in fibrin-polyurethane composites. *Tissue Eng Part A*, 15(7), 1729-1737.
- Li, Z., Yao, S. J., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2010). Chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells in fibrin-polyurethane composites is modulated by frequency and amplitude of dynamic compression and shear stress. *Tissue Eng Part A*, 16(2), 575-584.
- Lian, J. B., Javed, A., Zaidi, S. K., Lengner, C., Montecino, M., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., & Stein, G. S. (2004). Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 14(1-2), 1-41.
- Linsenmayer, T. F., Toole, B. P., & Trelstad, R. L. (1973). Temporal and spatial transitions in collagen types during embryonic chick limb development. *Dev Biol*, 35(2), 232-239.
- Liu, X., Sun, H., Yan, D., Zhang, L., Lv, X., Liu, T., Zhang, W., Liu, W., Cao, Y., & Zhou, G. (2010). In vivo ectopic chondrogenesis of BMSCs directed by mature chondrocytes. *Biomaterials*, 31(36), 9406-9414.
- Loeser, R. F. (1997). Growth factor regulation of chondrocyte integrins. Differential effects of insulin-like growth factor 1 and transforming growth factor beta on alpha 1 beta 1 integrin expression and chondrocyte adhesion to type VI collagen. *Arthritis Rheum*, 40(2), 270-276.
- Loeser, R. F. (2002). Integrins and cell signaling in chondrocytes. *Biorheology*, 39(1-2), 119-124.
- Longobardi, L., O'Rear, L., Aakula, S., Johnstone, B., Shimer, K., Chytil, A., Horton, W. A., Moses, H. L., & Spagnoli, A. (2006). Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J Bone Miner Res*, 21(4), 626-636.
- Lopez-Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L., & Massague, J. (1994). Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol*, 124(4), 557-568.
- Lopez-Casillas, F., Wrana, J. L., & Massague, J. (1993). Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell*, 73(7), 1435-1444.
- Loty, S., Foll, C., Forest, N., & Sautier, J. M. (2000). Association of enhanced expression of gap junctions with in vitro chondrogenic differentiation of rat nasal septal cartilage-released cells following their dedifferentiation and redifferentiation. *Arch Oral Biol*, 45(10), 843-856.
- Luo, G., D'Souza, R., Hogue, D., & Karsenty, G. (1995). The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development. *J Bone Miner Res*, 10(2), 325-334.
- Luo, Q., Song, G., Song, Y., Xu, B., Qin, J., & Shi, Y. (2009). Indirect co-culture with tenocytes promotes proliferation and mRNA expression of tendon/ligament related genes in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*, 61(1-2), 1-10.
- Mackay, A. M., Beck, S. C., Murphy, J. M., Barry, F. P., Chichester, C. O., & Pittenger, M. F. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*, 4(4), 415-428.

- Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K. S., & Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(1), 46-62.
- Mackie, E. J., Thesleff, I., & Chiquet-Ehrismann, R. (1987). Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J Cell Biol*, 105(6 Pt 1), 2569-2579.
- Madry, H., Grun, U. W., & Knutsen, G. (2011). Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Dtsch Arztebl Int*, 108(40), 669-677.
- Madry, H., & Pape, D. (2008). [Autologous chondrocyte transplantation]. *Orthopade*, 37(8), 756-763.
- Mageed, A. S., Pietryga, D. W., DeHeer, D. H., & West, R. A. (2007). Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells. *Transplantation*, 83(8), 1019-1026.
- Majumdar, M. K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W. B., Moorman, M. A., McIntosh, K. R., & Mosca, J. D. (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*, 10(2), 228-241.
- Mareddy, S., Crawford, R., Brooke, G., & Xiao, Y. (2007). Clonal isolation and characterization of bone marrow stromal cells from patients with osteoarthritis. *Tissue Eng*, 13(4), 819-829.
- Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J. P., & Roughley, P. J. (2008). Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 22(2), 351-384.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67, 753-791.
- Matsumoto, T., Okabe, T., Ikawa, T., Iida, T., Yasuda, H., Nakamura, H., & Wakitani, S. (2010). Articular cartilage repair with autologous bone marrow mesenchymal cells. *J Cell Physiol*, 225(2), 291-295.
- Mayne, R., Vail, M. S., Mayne, P. M., & Miller, E. J. (1976). Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(5), 1674-1678.
- McCarty, R. C., Gronthos, S., Zannettino, A. C., Foster, B. K., & Xian, C. J. (2009). Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*, 219(2), 324-333.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, 575-625.
- Mello, M. A., & Tuan, R. S. (1999). High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 35(5), 262-269.
- Melnicoff, M. J., Horan, P. K., Breslin, E. W., & Morahan, P. S. (1988). Maintenance of peritoneal macrophages in the steady state. *J Leukoc Biol*, 44(5), 367-375.
- Meretoja, V. V., Dahlin, R. L., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2012). Enhanced chondrogenesis in co-cultures with articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 33(27), 6362-6369.
- Miaczynska, M., & Stenmark, H. (2008). Mechanisms and functions of endocytosis. *J Cell Biol*, 180(1), 7-11.
- Miao, C. L., Duan, P., Mu, S. C., & Tang, S. J. (2011). [Experimental study of chondrogenesis in vitro by co-culture of bone marrow stromal cells and chondrocytes]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 27(2), 113-118.
- Mimura, T., Imai, S., Okumura, N., Li, L., Nishizawa, K., Araki, S., Ueba, H., Kubo, M., Mori, K., & Matsusue, Y. (2011). Spatiotemporal control of proliferation and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells recruited using

- collagen hydrogel for repair of articular cartilage defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 98(2), 360-368.
- Mitchell, E. A., Bergmeier, L. A., Doyle, C., Brookes, R., Hussain, L. A., Wang, Y., & Lehner, T. (1998). Homing of mononuclear cells from iliac lymph nodes to the genital and rectal mucosa in non-human primates. *Eur J Immunol*, 28(10), 3066-3074.
- Mithoefer, K., McAdams, T., Williams, R. J., Kreuz, P. C., & Mandelbaum, B. R. (2009). Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med*, 37(10), 2053-2063.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Burbelo, P. D., Akiyama, S. K., & Yamada, K. M. (1995). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol*, 131(3), 791-805.
- Morimoto, N., Saso, Y., Tomihata, K., Taira, T., Takahashi, Y., Ohta, M., & Suzuki, S. (2005). Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation. *J Surg Res*, 125(1), 56-67.
- Morotomi, T., Wada, M., Uehara, M., Enjo, M., & Isogai, N. (2012). Effect of Local Environment, Fibrin, and Basic Fibroblast Growth Factor Incorporation on a Canine Autologous Model of Bioengineered Cartilage Tissue. *Cells Tissues Organs*.
- Mueller, M. B., Fischer, M., Zellner, J., Berner, A., Dienstknecht, T., Prantl, L., Kujat, R., Nerlich, M., Tuan, R. S., & Angele, P. (2010). Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning. *Cells Tissues Organs*, 192(3), 158-166.
- Mueller, M. B., & Tuan, R. S. (2008). Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*, 58(5), 1377-1388.
- Mukherjee, S., Ghosh, R. N., & Maxfield, F. R. (1997). Endocytosis. *Physiol Rev*, 77(3), 759-803.
- Mulder, K. M. (2000). Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11(1-2), 23-35.
- Murakami, S., Kan, M., McKeenan, W. L., & de Crombrughe, B. (2000). Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(3), 1113-1118.
- Mwale, F., Billinghamurst, C., Wu, W., Alini, M., Webber, C., Reiner, A., Ionescu, M., Poole, J., & Poole, A. R. (2000). Selective assembly and remodelling of collagens II and IX associated with expression of the chondrocyte hypertrophic phenotype. *Dev Dyn*, 218(4), 648-662.
- Mwale, F., Stachura, D., Roughley, P., & Antoniou, J. (2006). Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. *J Orthop Res*, 24(8), 1791-1798.
- Nakamura, K., Shirai, T., Morishita, S., Uchida, S., Saeki-Miura, K., & Makishima, F. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells. *Exp Cell Res*, 250(2), 351-363.
- Nakamura, T., Sanokawa, R., Sasaki, Y., Ayusawa, D., Oishi, M., & Mori, N. (1996). N-Shc: a neural-specific adapter molecule that mediates signaling from neurotrophin/Trk to Ras/MAPK pathway. *Oncogene*, 13(6), 1111-1121.
- Nap, R. J., & Szleifer, I. (2008). Structure and interactions of aggrecans: statistical thermodynamic approach. *Biophys J*, 95(10), 4570-4583.

- Narcisi, R., Quarto, R., Ulivi, V., Muraglia, A., Molfetta, L., & Giannoni, P. (2012). TGF beta-1 administration during ex vivo expansion of human articular chondrocytes in a serum-free medium redirects the cell phenotype toward hypertrophy. *J Cell Physiol*, 227(9), 3282-3290.
- Naumann, A., Dennis, J. E., Awadallah, A., Carrino, D. A., Mansour, J. M., Kastenbauer, E., & Caplan, A. I. (2002). Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem*, 50(8), 1049-1058.
- Nehrer, S., Breinan, H. A., Ramappa, A., Shortkroff, S., Young, G., Minas, T., Sledge, C. B., Yannas, I. V., & Spector, M. (1997). Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *J Biomed Mater Res*, 38(2), 95-104.
- Nehrer, S., Dorotka, R., Domayer, S., Stelzeneder, D., & Kotz, R. (2009). Treatment of full-thickness chondral defects with hyalograft C in the knee: a prospective clinical case series with 2 to 7 years' follow-up. *Am J Sports Med*, 37 Suppl 1, 81S-87S.
- Nejadnik, H., Hui, J. H., Feng Choong, E. P., Tai, B. C., & Lee, E. H. (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med*, 38(6), 1110-1116.
- Nelson-Rees, W. A., Owens, R. B., Arnstein, P., & Kniazeff, A. J. (1976). Source, alterations, characteristics and use of a new dog cell line (Cf2Th). *In Vitro*, 12(10), 665-669.
- Neumann, K., Endres, M., Ringe, J., Flath, B., Manz, R., Haupl, T., Sittinger, M., & Kaps, C. (2007). BMP7 promotes adipogenic but not osteo-/chondrogenic differentiation of adult human bone marrow-derived stem cells in high-density micro-mass culture. *J Cell Biochem*, 102(3), 626-637.
- Ni, W. F., Yin, L. H., Lu, J., Xu, H. Z., Chi, Y. L., Wu, J. B., & Zhang, N. (2010). In vitro neural differentiation of bone marrow stromal cells induced by cocultured olfactory ensheathing cells. *Neurosci Lett*, 475(2), 99-103.
- Noth, U., Steinert, A. F., & Tuan, R. S. (2008). Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 4(7), 371-380.
- O'Bryan, J. P., Songyang, Z., Cantley, L., Der, C. J., & Pawson, T. (1996). A mammalian adaptor protein with conserved Src homology 2 and phosphotyrosine-binding domains is related to Shc and is specifically expressed in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(7), 2729-2734.
- Oates, K. M., Chen, A. C., Young, E. P., Kwan, M. K., Amiel, D., & Convery, F. R. (1995). Effect of tissue culture storage on the in vivo survival of canine osteochondral allografts. *J Orthop Res*, 13(4), 562-569.
- Oberlender, S. A., & Tuan, R. S. (1994). Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. *Cell Adhes Commun*, 2(6), 521-537.
- Oh, C. D., Chang, S. H., Yoon, Y. M., Lee, S. J., Lee, Y. S., Kang, S. S., & Chun, J. S. (2000). Opposing role of mitogen-activated protein kinase subtypes, erk-1/2 and p38, in the regulation of chondrogenesis of mesenchymes. *J Biol Chem*, 275(8), 5613-5619.
- Oh, C. D., Kim, S. J., Ju, J. W., Song, W. K., Kim, J. H., Yoo, Y. J., & Chun, J. S. (2001). Immunosuppressant rapamycin inhibits protein kinase C alpha and p38 mitogen-activated protein kinase leading to the inhibition of chondrogenesis. *Eur J Pharmacol*, 427(3), 175-185.
- Oh, D. K., Ciaraldi, T., & Henry, R. R. (2007). Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes Metab*, 9(3), 282-289.
- Okafor, C. C., Haleem-Smith, H., Laqueriere, P., Manner, P. A., & Tuan, R. S. (2006). Particulate endocytosis mediates biological responses of human mesenchymal stem cells to titanium wear debris. *J Orthop Res*, 24(3), 461-473.

- Olsen, B. R., Reginato, A. M., & Wang, W. (2000). Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 191-220.
- Parish, C. R. (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol*, 77(6), 499-508.
- Park, H., Temenoff, J. S., Tabata, Y., Caplan, A. I., & Mikos, A. G. (2007). Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 28(21), 3217-3227.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22(2), 153-183.
- Pelaez, D., Arita, N., & Cheung, H. S. (2012). Extracellular signal-regulated kinase (ERK) dictates osteogenic and/or chondrogenic lineage commitment of mesenchymal stem cells under dynamic compression. *Biochem Biophys Res Commun*, 417(4), 1286-1291.
- Pelicci, G., Dente, L., De Giuseppe, A., Verducci-Galletti, B., Giuli, S., Mele, S., Vetriani, C., Giorgio, M., Pandolfi, P. P., Cesareni, G., & Pelicci, P. G. (1996). A family of Shc related proteins with conserved PTB, CH1 and SH2 regions. *Oncogene*, 13(3), 633-641.
- Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Pawson, T., & Pelicci, P. G. (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*, 70(1), 93-104.
- Pelttari, K., Steck, E., & Richter, W. (2008). The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury*, 39 Suppl 1, S58-65.
- Pelttari, K., Winter, A., Steck, E., Goetzke, K., Hennig, T., Ochs, B. G., Aigner, T., & Richter, W. (2006). Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum*, 54(10), 3254-3266.
- Peterson, L., Vasiliadis, H. S., Brittberg, M., & Lindahl, A. (2010). Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med*, 38(6), 1117-1124.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147.
- Poole, A. R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., & Laverty, S. (2001). Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*(391 Suppl), S26-33.
- Prasadam, I., van Gennip, S., Friis, T., Shi, W., Crawford, R., & Xiao, Y. (2010). ERK-1/2 and p38 in the regulation of hypertrophic changes of normal articular cartilage chondrocytes induced by osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Arthritis Rheum*, 62(5), 1349-1360.
- Pricop, L., Salmon, J. E., Edberg, J. C., & Beavis, A. J. (1997). Flow cytometric quantitation of attachment and phagocytosis in phenotypically-defined subpopulations of cells using PKH26-labeled Fc gamma R-specific probes. *J Immunol Methods*, 205(1), 55-65.
- Puetzer, J. L., Petitte, J. N., & Lobo, E. G. (2010). Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng Part B Rev*, 16(4), 435-444.

- Punwar, S., & Khan, W. (2011). Mesenchymal stem cells and articular cartilage repair: clinical studies and future direction. *The open orthopaedics journal*, 5 Suppl 2, 296-301. doi: 10.2174/1874325001105010296
- Quarto, R., Campanile, G., Cancedda, R., & Dozin, B. (1997). Modulation of commitment, proliferation, and differentiation of chondrogenic cells in defined culture medium. *Endocrinology*, 138(11), 4966-4976.
- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutevov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., & Marcacci, M. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*, 344(5), 385-386.
- Ravichandran, K. S. (2001). Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene*, 20(44), 6322-6330.
- Re'em, T., Witte, F., Willbold, E., Ruvinov, E., & Cohen, S. (2012). Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone induced by spatially presented TGF-beta and BMP-4 in a bilayer affinity binding system. *Acta Biomater*, 8(9), 3283-3293.
- Reichenberger, E., Aigner, T., von der Mark, K., Stoss, H., & Bertling, W. (1991). In situ hybridization studies on the expression of type X collagen in fetal human cartilage. *Dev Biol*, 148(2), 562-572.
- Reilly, G. C., Golden, E. B., Grasso-Knight, G., & Leboy, P. S. (2005). Differential effects of ERK and p38 signaling in BMP-2 stimulated hypertrophy of cultured chick sternal chondrocytes. *Cell Commun Signal*, 3(1), 3.
- Rentsendorj, O., Nagy, A., Sinko, I., Daraba, A., Barta, E., & Kiss, I. (2005). Highly conserved proximal promoter element harbouring paired Sox9-binding sites contributes to the tissue- and developmental stage-specific activity of the matrilin-1 gene. *Biochem J*, 389(Pt 3), 705-716.
- Richardson, S. M., Walker, R. V., Parker, S., Rhodes, N. P., Hunt, J. A., Freemont, A. J., & Hoyland, J. A. (2006). Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells*, 24(3), 707-716.
- Rousselle, C., Barbier, M., Comte, V. V., Alcouffe, C., Clement-Lacroix, J., Chancel, G., & Ronot, X. (2001). Innocuousness and intracellular distribution of PKH67: a fluorescent probe for cell proliferation assessment. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 37(10), 646-655.
- Salter, D. M., Hughes, D. E., Simpson, R., & Gardner, D. L. (1992). Integrin expression by human articular chondrocytes. *Br J Rheumatol*, 31(4), 231-234.
- Schindler, O. S. (2011). Current concepts of articular cartilage repair. *Acta Orthop Belg*, 77(6), 709-726.
- Schmitt, B., Ringe, J., Haupl, T., Notter, M., Manz, R., Burmester, G. R., Sittinger, M., & Kaps, C. (2003). BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation*, 71(9-10), 567-577.
- Schneider, P. R., Buhrmann, C., Mobasher, A., Matis, U., & Shakibaei, M. (2011). Three-dimensional high-density co-culture with primary tenocytes induces tenogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 29(9), 1351-1360.
- Schneider, P. R. A. (2012). Tenogenes Potential caniner mesenchymaler Stammzellen in einem High-Density Ko-Kultur System. (Doctor medicinae (Dr. med.) Dissertation), Ludwig-Maximilians-Universität München. Retrieved from <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/14291/> (urn:nbn:de:bvb:19-142913)
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4(1-2), 7-25.

- Schroter-Kermani, C., Hinz, N., Risse, P., Zimmermann, B., & Merker, H. J. (1991). The extracellular matrix in cartilage organoid culture: biochemical, immunomorphological and electron microscopic studies. *Matrix*, 11(6), 428-441.
- Schulze-Tanzil, G., de Souza, P., Villegas Castrejon, H., John, T., Merker, H. J., Scheid, A., & Shakibaei, M. (2002). Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res*, 308(3), 371-379.
- Schulze-Tanzil, G., Mobasheri, A., de Souza, P., John, T., & Shakibaei, M. (2004). Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage*, 12(6), 448-458.
- Schwartz, N. B., Pirok, E. W., 3rd, Mensch, J. R., Jr., & Domowicz, M. S. (1999). Domain organization, genomic structure, evolution, and regulation of expression of the aggrecan gene family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 62, 177-225.
- Seeger, R., & Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *Faseb J*, 9(9), 726-735.
- Seifarth, C. (2009). Wachstumsfaktor-induzierte Stabilisierung des chondrogenen Potentials der humanen Chondrozyten in vitro: (Mögliche Anwendung für das Tissue-Engineering). (Doctor medicinae (Dr. med.) Dissertation), Freie Universität Berlin. Retrieved from http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000011687 (urn:nbn:de:kobv:188-fudissthesis000000011687-0)
- Sekiya, I., Tsuji, K., Koopman, P., Watanabe, H., Yamada, Y., Shinomiya, K., Nifuji, A., & Noda, M. (2000). SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem*, 275(15), 10738-10744.
- Serra, R., Karaplis, A., & Sohn, P. (1999). Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. *J Cell Biol*, 145(4), 783-794.
- Seyedin, S. M., Thompson, A. Y., Bentz, H., Rosen, D. M., McPherson, J. M., Conti, A., Siegel, N. R., Galluppi, G. R., & Piez, K. A. (1986). Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 261(13), 5693-5695.
- Shakibaei, M. (1998). Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. *Exp Cell Res*, 240(1), 95-106.
- Shakibaei, M., Allaway, D., Nebrich, S., & Mobasheri, A. (2012). Botanical Extracts from Rosehip (*Rosa canina*), Willow Bark (*Salix alba*), and Nettle Leaf (*Urtica dioica*) Suppress IL-1beta-Induced NF-kappaB Activation in Canine Articular Chondrocytes. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 509383.
- Shakibaei, M., Csaki, C., & Mobasheri, A. (2008). Diverse roles of integrin receptors in articular cartilage. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 197, 1-60.
- Shakibaei, M., John, T., De Souza, P., Rahmanzadeh, R., & Merker, H. J. (1999). Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem J*, 342 Pt 3, 615-623.
- Shakibaei, M., Schroter-Kermani, C., & Merker, H. J. (1993). Matrix changes during long-term cultivation of cartilage (organoid or high-density cultures). *Histol Histopathol*, 8(3), 463-470.
- Shakibaei, M., Zimmermann, B., & Merker, H. J. (1995). Changes in integrin expression during chondrogenesis in vitro: an immunomorphological study. *J Histochem Cytochem*, 43(10), 1061-1069.
- Shi, S., & Gronthos, S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*, 18(4), 696-704.

- Shortkroff, S., Barone, L., Hsu, H. P., Wrenn, C., Gagne, T., Chi, T., Breinan, H., Minas, T., Sledge, C. B., Tubo, R., & Spector, M. (1996). Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 17(2), 147-154.
- Sjoblom, B., Salmazo, A., & Djinoovic-Carugo, K. (2008). Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci*, 65(17), 2688-2701.
- Smith, S. M., Crowe, D. L., & Lee, M. K. (2006). beta1 integrins modulate p66ShcA expression and EGF-induced MAP kinase activation in fetal lung cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 342(3), 909-918.
- Solchaga, L. A., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I. (2001). Cartilage regeneration using principles of tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res*(391 Suppl), S161-170.
- Song, L., Webb, N. E., Song, Y., & Tuan, R. S. (2006). Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells*, 24(7), 1707-1718.
- Spencer, N. D., Gimble, J. M., & Lopez, M. J. (2011). Mesenchymal stromal cells: past, present, and future. *Vet Surg*, 40(2), 129-139.
- Spranger, J., Winterpacht, A., & Zabel, B. (1994). The type II collagenopathies: a spectrum of chondrodysplasias. *Eur J Pediatr*, 153(2), 56-65.
- Stanton, L. A., Underhill, T. M., & Beier, F. (2003). MAP kinases in chondrocyte differentiation. *Dev Biol*, 263(2), 165-175.
- Stevens, R. L., Parsons, W. G., Austen, K. F., Hein, A., & Caulfield, J. P. (1985). Novel inhibition of proteoglycan synthesis and exocytosis by diethylcarbamazine in the Swarm rat chondrocyte. *J Biol Chem*, 260(9), 5777-5786.
- Stirpe, N. S., & Goetinck, P. F. (1989). Gene regulation during cartilage differentiation: temporal and spatial expression of link protein and cartilage matrix protein in the developing limb. *Development*, 107(1), 23-33.
- Sugito, T., Kagami, H., Hata, K., Nishiguchi, H., & Ueda, M. (2004). Transplantation of cultured salivary gland cells into an atrophic salivary gland. *Cell Transplant*, 13(6), 691-699.
- Sunaga, T., Oh, N., Hosoya, K., Takagi, S., & Okumura, M. (2011). Inhibitory Effects of Pentosan Polysulfate Sodium on MAP-Kinase Pathway and NF-kappaB Nuclear Translocation in Canine Chondrocytes In Vitro. *J Vet Med Sci*.
- Swiderski, R. E., & Solursh, M. (1992). Localization of type II collagen, long form alpha 1(IX) collagen, and short form alpha 1(IX) collagen transcripts in the developing chick notochord and axial skeleton. *Dev Dyn*, 194(2), 118-127.
- Talavera-Adame, D., Wu, G., He, Y., Ng, T. T., Gupta, A., Kurtovic, S., Hwang, J. Y., Farkas, D. L., & Dafoe, D. C. (2011). Endothelial cells in co-culture enhance embryonic stem cell differentiation to pancreatic progenitors and insulin-producing cells through BMP signaling. *Stem Cell Rev*, 7(3), 532-543.
- Tamkun, J. W., DeSimone, D. W., Fonda, D., Patel, R. S., Buck, C., Horwitz, A. F., & Hynes, R. O. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*, 46(2), 271-282.
- Tang, X., Sheng, L., Xie, F., & Zhang, Q. (2012). Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes using chondrocyte extract. *Mol Med Rep*, 6(4), 745-749.
- Tapp, H., Deepe, R., Ingram, J. A., Kuremsky, M., Hanley, E. N., Jr., & Gruber, H. E. (2008). Adipose-derived mesenchymal stem cells from the sand rat: transforming growth factor beta and 3D co-culture with human disc cells stimulate proteoglycan and collagen type I rich extracellular matrix. *Arthritis Res Ther*, 10(4), R89.

- Tario, J. D., Jr., Gray, B. D., Wallace, S. S., Muirhead, K. A., Ohlsson-Wilhelm, B. M., & Wallace, P. K. (2007). Novel lipophilic tracking dyes for monitoring cell proliferation. *Immunol Invest*, 36(5-6), 861-885.
- Toh, W. S., Yang, Z., Liu, H., Heng, B. C., Lee, E. H., & Cao, T. (2007). Effects of culture conditions and bone morphogenetic protein 2 on extent of chondrogenesis from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25(4), 950-960.
- Toole, B. P. (1972). Hyaluronate turnover during chondrogenesis in the developing chick limb and axial skeleton. *Dev Biol*, 29(3), 321-329.
- Toseland, C. D., Campbell, S., Francis, I., Bugelski, P. J., & Mehdi, N. (2001). Comparison of adipose tissue changes following administration of rosiglitazone in the dog and rat. *Diabetes Obes Metab*, 3(3), 163-170.
- Tschan, T., Bohme, K., Conscience-Egli, M., Zenke, G., Winterhalter, K. H., & Bruckner, P. (1993). Autocrine or paracrine transforming growth factor-beta modulates the phenotype of chick embryo sternal chondrocytes in serum-free agarose culture. *J Biol Chem*, 268(7), 5156-5161.
- Tuli, R., Tuli, S., Nandi, S., Huang, X., Manner, P. A., Hozack, W. J., Danielson, K. G., Hall, D. J., & Tuan, R. S. (2003). Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem*, 278(42), 41227-41236.
- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 8(9), 726-736.
- Umlauf, D., Frank, S., Pap, T., & Bertrand, J. (2010). Cartilage biology, pathology, and repair. *Cell Mol Life Sci*, 67(24), 4197-4211.
- van Dyk, G. E., DeJardin, L. M., Flo, G., & Johnson, L. L. (1998). Cancellous bone grafting of large osteochondral defects: an experimental study in dogs. *Arthroscopy*, 14(3), 311-320.
- Vavken, P., & Samartzis, D. (2010). Effectiveness of autologous chondrocyte implantation in cartilage repair of the knee: a systematic review of controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage*, 18(6), 857-863.
- Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S. J., Young, R. G., Mansour, J. M., Caplan, A. I., & Goldberg, V. M. (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 76(4), 579-592.
- Wakitani, S., Imoto, K., Yamamoto, T., Saito, M., Murata, N., & Yoneda, M. (2002). Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*, 10(3), 199-206.
- Wakitani, S., Mitsuoka, T., Nakamura, N., Toritsuka, Y., Nakamura, Y., & Horibe, S. (2004). Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell transplantation*, 13(5), 595-600.
- Wallace, P. K., & Muirhead, K. A. (2007). Cell tracking 2007: a proliferation of probes and applications. *Immunol Invest*, 36(5-6), 527-561.
- Wallace, P. K., Palmer, L. D., Perry-Lalley, D., Bolton, E. S., Alexander, R. B., Horan, P. K., Yang, J. C., & Muirhead, K. A. (1993). Mechanisms of adoptive immunotherapy: improved methods for in vivo tracking of tumor-infiltrating lymphocytes and lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res*, 53(10 Suppl), 2358-2367.
- Wary, K. K., Mainiero, F., Isakoff, S. J., Marcantonio, E. E., & Giancotti, F. G. (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell*, 87(4), 733-743.

- Weiss, S., Hennig, T., Bock, R., Steck, E., & Richter, W. (2010). Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*, 223(1), 84-93.
- Widelitz, R. B., Jiang, T. X., Murray, B. A., & Chuong, C. M. (1993). Adhesion molecules in skeletogenesis: II. Neural cell adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis. *J Cell Physiol*, 156(2), 399-411.
- Widuchowski, W., Widuchowski, J., & Trzaska, T. (2007). Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee*, 14(3), 177-182.
- Williams, C. G., Kim, T. K., Taboas, A., Malik, A., Manson, P., & Elisseeff, J. (2003). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a photopolymerizing hydrogel. *Tissue Eng*, 9(4), 679-688.
- Willingham, M. C., & Pastan, I. (1984). Endocytosis and exocytosis: current concepts of vesicle traffic in animal cells. *Int Rev Cytol*, 92, 51-92.
- Wong, M., & Carter, D. R. (2003). Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone*, 33(1), 1-13.
- Woods, V. L., Jr., Schreck, P. J., Gesink, D. S., Pacheco, H. O., Amiel, D., Akeson, W. H., & Lotz, M. (1994). Integrin expression by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 37(4), 537-544.
- Wuelling, M., & Vortkamp, A. (2010). Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatr Nephrol*, 25(4), 625-631.
- Xia, W., Jin, Y. Q., Kretlow, J. D., Liu, W., Ding, W., Sun, H., Zhou, G., Zhang, W., & Cao, Y. (2009). Adenoviral transduction of hTGF-beta1 enhances the chondrogenesis of bone marrow derived stromal cells. *Biotechnol Lett*, 31(5), 639-646.
- Xie, W. F., Zhang, X., Sakano, S., Lefebvre, V., & Sandell, L. J. (1999). Trans-activation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by Sox9. *J Bone Miner Res*, 14(5), 757-763.
- Yamamura, Y., Rodriguez, N., Schwartz, A., Eylar, E., Bagwell, B., & Yano, N. (1995a). A new flow cytometric method for quantitative assessment of lymphocyte mitogenic potentials. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 41 Suppl 1, S121-132.
- Yamamura, Y., Rodriguez, N., Schwartz, A., Eylar, E., & Yano, N. (1995b). Anti-CD4 cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity in HIV+ patients: flow cytometric analysis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 41 Suppl 1, S133-144.
- Yin, T., & Li, L. (2006). The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*, 116(5), 1195-1201.
- Yoo, J. U., Barthel, T. S., Nishimura, K., Solchaga, L., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., & Johnstone, B. (1998). The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*, 80(12), 1745-1757.
- Yoon, Y. M., Oh, C. D., Kim, D. Y., Lee, Y. S., Park, J. W., Huh, T. L., Kang, S. S., & Chun, J. S. (2000). Epidermal growth factor negatively regulates chondrogenesis of mesenchymal cells by modulating the protein kinase C-alpha, Erk-1, and p38 MAPK signaling pathways. *J Biol Chem*, 275(16), 12353-12359.
- Young, A. J., & Hay, J. B. (1995). Rapid turnover of the recirculating lymphocyte pool in vivo. *Int Immunol*, 7(10), 1607-1615.
- Yu, L., Hebert, M. C., & Zhang, Y. E. (2002). TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *Embo J*, 21(14), 3749-3759.
- Zhang, L., Su, P., Xu, C., Yang, J., Yu, W., & Huang, D. (2010). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnol Lett*, 32(9), 1339-1346.

- Zhao, L., & Hantash, B. M. (2011). TGF-beta1 regulates differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Vitam Horm*, 87, 127-141.
- Zhen, X., Wei, L., Wu, Q., Zhang, Y., & Chen, Q. (2001). Mitogen-activated protein kinase p38 mediates regulation of chondrocyte differentiation by parathyroid hormone. *J Biol Chem*, 276(7), 4879-4885.

8. DANKSAGUNG

Mein herzlicher und besonderer Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Putz** für seine stets kompetente, geduldige und intensive Betreuung der Arbeit, seine ständige Erreichbarkeit und seinen unermüdlichen persönlichen Einsatz für mich in der gesamten Promotionsphase, ohne die diese Arbeit sicherlich nicht zustande gekommen wäre. Die Zusammenarbeit mit ihm war nicht nur fachlich äußerst bereichernd, sondern auch menschlich sehr prägend. Ich bin Prof. Putz zur tiefen und unvergesslichen Dankbarkeit verpflichtet.

Ebenso möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Shakibaei bedanken. Ich danke Herrn **Prof. Dr. med. vet. Shakibaei** für die Überlassung des Promotionsthemas, die Benutzung des Labors und die kritische wissenschaftliche Diskussion. Meiner Post-Doc-Betreuerin Frau **Dr. med. vet. Constanze Buhrmann** (ehemals Csaki) danke ich ganz herzlich für die stets fachkundige und freundliche Unterstützung bei zahlreichen wissenschaftlichen Fragestellungen, die einen nicht zu unterschätzenden Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat. Bei allen Mitdoktoranten möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung bedanken.

Zusätzlich danke ich Frau **PD. Dr. rer. nat. Denitsa Docheva** und allen Mitarbeitern ihrer Arbeitsgruppe ganz herzlich für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor und die Hilfestellung bei diversen Auswertungen.

Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank Frau **Prof. Dr. med. vet. Ulrike Matis** (ehemals Lehrstuhlinhaberin für Allgemeine und Spezielle Chirurgie der Chirurgischen Tierklinik der LMU München) für die Unterstützung bei der Gewinnung der Gewebeproben und die Bereitstellung des Spendermaterials.

Bei allen meinen guten Freunden möchte ich mich für die langjährige Unterstützung und zahlreichen guten Ratschläge zur rechten Zeit bedanken.

Nicht zuletzt bin ich von Herzen meiner Lebenspartnerin Haoyin und meinen Eltern Jialing Ye und Han Xiao zutiefst dankbar für ihre Begleitung durch das Studium und die

DANKSAGUNG

Promotion und ihre liebevolle, fürsorgliche, motivierende und starke Unterstützung in allen Lebenslagen, die mich erst so weit gebracht haben.

9. ANHANG

9.1. Veröffentlichungen und Vorträge

Vorträge

Chondrogenese durch Ko-Kultur: Intensive Interaktion zwischen mesenchymalen Stammzellen und primären Chondrozyten *in vitro*.

XXX. Münchner Symposion für Experimentelle Orthopädie, München Februar 2008

Stimulation der Chondrogenese in mesenchymalen Stammzellen durch dreidimensionale Ko-Kultur mit primären Chondrozyten: Intensive zelluläre Interaktion.

Wochenendseminar des 6. Promotionsstudiums "Molekulare Medizin" und "Systembiologische Medizin", Herrsching Mai 2008

Das 3-D Massenkulturmodell

Methodenkolloquium, Förderung für Forschung und Lehre der LMU München, München Mai 2007

Eidesstattliche Versicherung

Han, Ye

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Untersuchung des chondrogenen Differenzierungspotenzials von kaninen mesenchymalen Stammzellen (kMSZ) durch Ko-Kultur mit kaninen primären Chondrozyten (kPCh) in einem 3D-Massenkulturmodell“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, den 08.09.2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand